

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Научный совет Российской академии наук по хроматографии

**Руководство
по капиллярному
электрофорезу**

Москва 1996 год

Книга представляет собой практическое руководство по капиллярному электрофорезу - новому методу анализа, обладающему высокой разрешающей способностью и сочетающему преимущества электрофоретических методов разделения с возможностью автоматизации анализа и простотой количественного расчета, характерного для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Быстрота анализа и эффективность разделения в сочетании с широкой областью применения делают капиллярный электрофорез одним из наиболее высокоэффективных аналитических методов.

Материал книги включает основы капиллярного электрофореза как количественного метода анализа сложных биологических смесей, описание аппаратного оформления метода и некоторые конкретные методики анализа.

В приложении к книге дано краткое описание приборов для капиллярного электрофореза, выпускаемых некоторыми зарубежными и отечественными фирмами.

Книга рассчитана на ученых и специалистов, работающих в области определения состава сложных биологических смесей при анализе объектов окружающей среды, продуктов питания, лекарственных препаратов, в клиническом и токсикологическом анализе.

Перевод: д.х.н. Р.Ш. Вартапетян

Под редакцией д.х.н. А.М.Волощука

Ил.107.Табл. 30.

Рецензент: к.х.н. И.В. Назимов

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
Предисловие	4
1. Введение	5
2. Основы капиллярного электрофореза (КЭ)	7
3. Электрофоретическое перемещение	9
4. Электроосмотический поток (ЭОП)	10
5. Уширение полос	15
5.1. Потеря эффективности вследствие диффузии	15
5.2. Потеря эффективности в результате температурных эффектов	17
5.3. Потеря эффективности в результате электрической дисперсии	19
5.4. Адсорбция на стенках	21
5.5. Перегрузка системы разделения	22
5.6. Наложение профилей потока	23
5.7. Резюме	23
6. Аппаратура	24
6.1. Источники напряжения	24
6.2. Капилляры	24
Характеристики капилляра	26
Таблица 7	26
6.3. Ввод пробы	27
6.3.1. Ввод пробы давлением	27
6.3.3. Электрокинетический ввод пробы	29
Таблица. 10	29
6.3.4. Делитель пробы	30
6.3.5. Эффекты обогащения при вводе пробы (стэкинг)	32
6.4. Термостатирование	34
6.5. Детектирование	35
6.5.1. Уф-детектирование	35
Методы концентрирования («стэкинг»-мвтоды) в КЭ	36
6.5.2. Флуоресцентное детектирование	39
6.5.3. Прочие методы детектирования	40
6.6. Количественный анализ	42
Методы детектирования в КЭ	42
Таблица 13	45
Зависимость времени прохождения пиками «окна» детектора от	45
Таблица 14	45
Таблица 16	47
7. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ)	48
7.1. Влияние pH	49
7.2. Влияние концентрации буфера	51
7.3. Выбор буфера	51
7.4. Области применения	51
8. Непрямое Уф-детектирование в КЭ	53
8.1. Непрямое Уф-детектирование анионов	53
8.2. Непрямое Уф-детектирование катионов	58
8.3. Сопоставление методов прямого и непрямого Уф-детектирования	64
9. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) белков	66
9.1. Оптимизация разделения в немодифицированных капиллярах	66
9.1.1. Значения pH	66
9.1.2. Добавление солей к буферу	67
9.1.3. Добавка органического модификатора к буферу	67
9.1.4. Применение буферных добавок для разделения белков	67
(динамическое наполнение капилляров)	67
9.2. Использование капилляров с модифицированной поверхностью	69
9.2.1. Типы покрытий поверхности в КЭ	70
9.2.2. Изготовление химически модифицированных капилляров	71
9.2.2.1. Предварительная обработка кварцевых капилляров	71
9.2.2.2. Методы покрытия	71
9.2.3. Характеристики заполненных капилляров в КЭ	72
9.3. Обзор важнейших химических покрытий	72
9.3.1. Общепринятые покрытия	72
9.3.1.1. Алкил-силановые покрытия	72
9.3.1.2. Арилпентафторидные покрытия	73
9.3.1.3. Гидрофильные гидрокоил- и полиэфирные покрытия	74
9.3.1.4. Покрытия на основе белков	75

9.3.2. Полимерные покрытия	75
9.3.2.1. Покрытия на основе линейных полиакриламидов.....	75
9.3.2.2. Покрытия на основе поли(винилпирролидона).....	76
9.3.2.3. Покрытие капилляров поли(этиленгликолем)	77
(нанесение ионных слоев).....	77
9.3.2.4. Покрытие капилляров поли(метилглутаматом)	78
9.3.2.5. Капилляры для ГХ и СКФХ с нанесенным полимером, используемые в КЗ.....	78
9.4. Выводы	79
10. Мицеллярная электрокинетическая хроматография	80
11. Разделение энантиомеров.....	88
11.2. Смешанные химические разделяющие системы.....	90
11.3. Капилляры с ЭОП и без него.....	91
11.4. Выбор подходящего LLQ	91
11.5. Оптимизация концентрации ЦД	91
11.6. Оптимизация значений pH.....	93
11.7. Оптимизация фоновых электролитов.....	94
11.8. Буферные добавки	95
12. Капиллярный гелевый электрофорез	96
12.1. Гели на основе акриламида	96
12.1.1. Поперечносшитые полиакриламидные гели.....	97
12.1.2. Линейные полиакриламидные цепи.	98
12.1.3. Полиакриламидный гелевый электрофорез белков с ДДСН	101
12.2. Гели на основе полисахаридов и других полимеров	102
12.3. Модели миграции биополимеров в полимерных растворах	103
13. Изоэлектрическая фокусировка (ИЭФ) в капиллярах	105
14. Изотахофорез (ИТФ).....	108
15. Электрохроматография (ЭХ).....	109
16. Перспективы.....	110
Рекомендуемые книги:.....	110
Обзорные статьи	110
Список сокращений, часто встречающихся в тексте:	111

Предисловие

В основу книги положены лекции профессора Саарбрюкенского университета (Германия) Х.Энгельгардта, предназначенные для специалистов, желающих овладеть капиллярным электрофорезом - новым современным методом анализа сложных смесей.

Книга выпущена в качестве учебного пособия для школы по капиллярному электрофорезу, проводимой для российских ученых и специалистов сотрудниками Саарбрюкенского университета под руководством проф. Х. Энгельгардта в Москве в апреле 1996 года. Программа школы включает практические занятия на приборах некоторых зарубежных фирм. В приложении к "Руководству по капиллярному электрофорезу" приведена информация о фирмах, специализирующихся в выпуске аппаратуры для капиллярного электрофореза: Beckman, BioRad, Cheminst (Dionex, Gilson), Hewlett Packard, Perkin-Elmer, Termo Separation Products, Waters, Экотехника.

Издание данной книги стало возможным благодаря финансовой поддержке фонда "Фольксваген" (Германия).

Научный совет РАН по хроматографии выражает искреннюю благодарность проф. Х.Энгельгардту и его сотрудникам за предоставленные материалы, фонду "Фольксваген" за финансовую поддержку, а также д.х.н. Р.Ш. Вартапетяну, д.х.н. А.М. Волощука, к.х.н. Л.Н. Коломиец, к.х.н. И.В. Назимову и Р.И.Хамидуллину за подготовку книги "Руководство по капиллярному электрофорезу" к изданию.

1. Введение

Такие аналитические методы, как хроматография и электрофорез, находят широкое применение в определении состава сложных биологических смесей при анализе объектов окружающей среды и промышленной продукции.

Методы газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяют за короткое время проводить разделение, идентификацию и количественное определение состава сложных смесей. Благодаря сочетанию высокоэффективных разделительных систем с чувствительными, селективными и специфическими детекторами, такими, например, как диодно-матричный детектор (ДМД) в видимой и УФ-областях спектра, масс-спектрометрия и ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС) удается надежно идентифицировать отдельные вещества. Приборное оформление этих методов настолько хорошо развито, что почти всегда удается автоматизировать проведение хроматографических анализов.

Области применения методов ГХ и ВЭЖХ ограничиваются требованиями, предъявляемыми к пробам в каждом из этих аналитических методов. Поэтому ВЭЖХ в настоящее время является наиболее широко распространенным методом разделения с хорошими перспективами на дальнейшее расширение области его применения. (Темпы прироста рынка приборов для ВЭЖХ стабильно превышают 10% в год). Проблемы при применении ВЭЖХ возникают тогда, когда необходимо быстро и с большой эффективностью проанализировать полярные и ионогенные пробы, особенно пробы, обладающие высокой основностью, а также биополимеры. Это - одна из наиболее сложных проблем хроматографии, связанная с использованием стационарных фаз на основе силикагеля. Хотя в последние годы появились фазы, при использовании которых удается решить эти проблемы, для дальнейшего развития аналитических методов разделения ионогенных веществ необходимо высокое мастерство и глубокое понимание протекающих при этом многообразных сорбционных ионообменных процессов. Фазы на основе чистых органических веществ из-за своей способности к набуханию обладают меньшей эффективностью и ограниченной устойчивостью к давлению по сравнению со стационарными фазами на основе силикагеля. Поэтому неудивительно, что эти фазы до настоящего времени не получили широкого распространения. Хотя в распоряжении исследователей имеются ионообменные фазы как на основе силикагеля, так и на основе полимеров, ионообменная хроматография также не получила широкого распространения, так как для разделения компонентов необходима градиентная техника (градиенты pH или ионной силы). Для ионогенных соединений предлагается электрофоретическая техника разделения.

Заряженные частицы перемещаются в растворе под влиянием электрического поля с различной скоростью. Уже в первой половине нашего столетия для этого явления было введено понятие "электрофорез" или "электрический перенос". Различие скоростей перемещения может быть обусловлено двумя причинами: (а) различные молекулы несут на себе различные заряды и поэтому при наложении электрического поля могут ускоряться в различной степени; (б) их перемещению препятствует различающееся по величине сопротивление трения. В простейшем случае разделительная среда (раствор электролита) находится в трубке. Из-за отвода Джоулева тепла на практике зачастую наблюдается искажение зон за счет различных плотностей электролита и конвекционных потоков. В случае классического электрофореза применяются гели или полоски бумаги, пропитанные электролитами для того, чтобы уменьшить помехи, вызванные конвекцией, а также чтобы увеличить сопротивление трения макро-молекул с незначительными различиями в зарядах и тем самым усилить эффект разделения. Использование полиакриламидного гель-электрофореза (ПААГ-электрофореза) позволяет проводить эффективное разделение молекул ДНК и белков. Благодаря изменению степени сшивания геля может быть оптимизирована производительность разделения. При использовании гель-электрофореза белков, денатурированных додецилсульфатом натрия (ДДСН), возможно непосредственное определение их молекулярной массы. Разделение в этом случае основано исключительно на затруднении миграции пробы через гель (без геля все денатурированные додецилсульфатом натрия белки перемещаются с одинаковой скоростью).

Классический электрофорез (гель-электрофорез или электрофорез на бумаге) имеет две характерные особенности. Во первых, количественный анализ возможен только с

помощью измерений в отраженном свете, а в случае белков только по степени их окрашивания, и поэтому часто бывает ошибочным. Во-вторых, падение напряжения при прохождении через гель не может быть выбрано слишком высоким. Степень нагрева возрастает пропорционально напряжению, так что необходимо эффективное охлаждение, чтобы избежать высыхания геля. Время анализа на отрезке геля длиной в 10 см может достигать нескольких часов. В любом случае при гель-электрофорезе возможно проводить одновременно большое число разделений на одном геле, при этом производительность сильно увеличивается. В плоскостном варианте метода, кроме того, можно без затруднений проводить двумерные 2D-процессы с использованием различных механизмов разделения. Отметим также высокую разрешающую способность 2D-гель-электрофореза при анализе белков.

2. Основы капиллярного электрофореза (КЭ)

Развитие КЭ началось с пионерских работ Миккерса и Эвериртса (конец 70-х годов) и Йортенсона и Лукаса (начало 80-х годов). Быстрое развитие метода было обусловлено двумя решающими усовершенствованиями: во-первых, был существенно уменьшен внутренний диаметр разделительного капилляра; во-вторых, детектирование по электропроводности, пришедшее первоначально из изотахофореза, было заменено на прямое УФ-детектирование в потоке жидкости. Предпосылкой для дальнейшего развития метода была возможность использования кварцевого капилляра с высокой прозрачностью в ближней УФ-области и с равномерным внутренним диаметром от 50 до 100 мкм. При этом улучшились как разделение, так и возможности детектирования.

С помощью кварцевого капилляра с внутренним диаметром 50-100 мкм удалось достигнуть высокоэффективного разделения белков и дансил-аминокислот, при котором из-за сравнительно большого отношения поверхности к объему было сильно уменьшено влияние мешающей разделению термически индуцированной конвекции. Применение кварцевого капилляра позволило использовать модифицированный ВЭЖХ-детектор для определения разделяемых веществ непосредственно в капилляре. Простота аппаратуры и возросшая потребность в разделении биомолекул привели во второй половине 80-х годов к повышенному интересу к данному методу.

Наряду с КЗЭ, при котором удается осуществить разделение только за счет разницы в подвижности, и который в настоящее время представляет собой наиболее распространенный метод, выделяют также капиллярный гель электрофорез (КГЭ) с капилляром, заполненным гелем. При этом на электрофоретическую миграцию молекул оказывает влияние матрица геля, и поэтому достигается селективное разделение молекул по размерам. Незаряженные молекулы можно разделять с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). В данном случае к буферу добавляется детергент, и нейтральные молекулы распределяются между буфером и мицеллами в соответствии с их гидрофобностью. Разделение основано на подвижности мицелл, заряженных в большинстве случаев отрицательно. Поскольку в основе разделения лежит процесс распределения, можно с полным основанием говорить о хроматографическом методе. При изозлектрической фокусировке (ИЭФ) происходит разделение в градиенте pH, формируемом добавлением амфолита к буферу в электрическом поле. Небольшое распространение получила пока электрохроматография (ЭХ), при которой применяется стационарная среда ВЭЖХ, а течение элюента и перенос пробы происходит только за счет электроосмотического потока. В качестве самой старой капиллярной техники следует упомянуть изотахофорез (ИТФ), который в настоящее время вновь приобрел значение для концентрирования проб в КЭ.

Схематическое изображение аппаратуры КЭ представлено на рис. 1. Тонкий кварцевый капилляр (25-100 мкм) длиной от 20 до 100 см соединяет два буферных сосуда, между которыми приложено напряжение около 30 кВ. Сравнительно небольшое количество пробы (несколько нл) вводится на анодном конце капилляра. Это достигается подъемом или опусканием соответствующих буферных сосудов, созданием давления в сосуде для пробы, созданием вакуума в катодном буферном резервуаре или просто за счет электрофоретической миграции пробы в капилляр. Достоинства и недостатки разных способов ввода пробы подробно обсуждаются в разделе "Аппаратура".

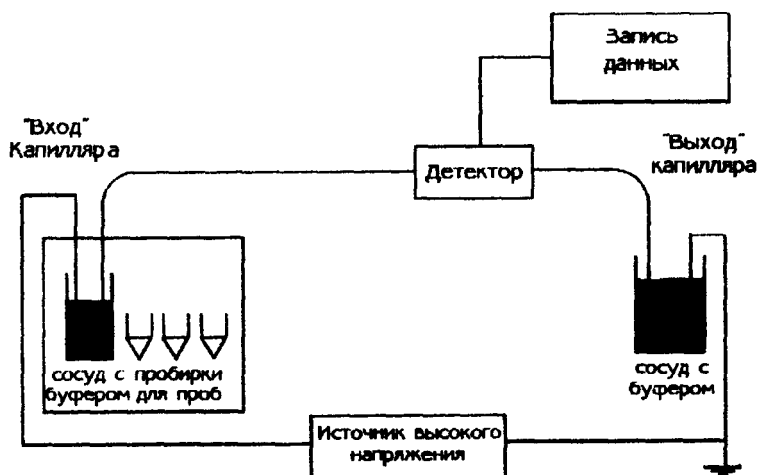


Рис. 1. Схема аппаратуры КЭ.

Разделение пробы достигается приложением напряжения к буферным сосудам. Возникающее в капилляре электрическое поле вызывает миграцию зоны пробы. На электрофоретическое перемещение всегда накладывается более или менее интенсивный электроосмотический поток (ЭОП), который способствует пассивному транспорту зоны пробы, а не ее разделению.

Этот ЭОП сильно зависит от значений pH буфера и от свойств поверхности капилляра. Он может быть настолько большим, что будут двигаться не только нейтральные молекулы, но даже отрицательно заряженные ионы могут перемещаться к детектору, несмотря на их электрофоретическую миграцию.

После того, как в большинстве буферов на поверхности кварцевых капилляров из-за диссоциации силанольных групп образуются отрицательные заряды, вблизи стенки индуцируются положительные заряды и электроосмотический поток направлен к катоду. Это обуславливает необходимость расположения детектора вблизи катодного пространства. ЭОП помогает переносить зоны проб к детектору настолько, что при достаточно больших значениях ЭОП к катоду могут переноситься даже анионы. Пример разделения катионных, анионных и нейтральных веществ посредством капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) приведен на рис. 2. При этих условиях все незаряженные молекулы перемещаются с одинаковой скоростью, равной скорости электроосмотического потока, и не могут быть разделены, в то время как разделение заряженных ионов возможно благодаря их различной электрофоретической подвижности.

Наряду с этой простейшей формой капиллярного электрофореза, существует множество его вариантов, которые будут обсуждаться в последующих разделах при рассмотрении наиболее типичных областей их применения

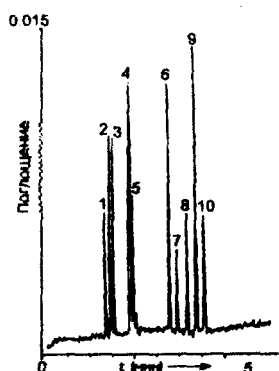


Рис.2.

Пример разделения нейтральных, положительно и отрицательно заряженных проб в одном опыте. Условия разделения: $L=30/37$ см; внутренний диаметр - 75 мкм; буфер - 33 мМ борат, pH 9.5; $E=350$ В/см; детектирование УФ/214 нм. (1) триметилфениламмонийбромид, (2) гистамин, (3) 4-аминопиридин, (4) бензиновый спирт, (5) фенол, (6) сингальдегид, (7) 2-(парагидроксифенил)-уксусная кислота, (8) бензойная кислота, (9) ванилиновая кислота, (10) парагидроксibenзойная кислота.

3. Электрофоретическое перемещение

Увеличивающееся напряжение и возрастающая при этом напряженность поля E приводят к постоянному повышению скорости перемещения U (скорости электрофореза) и, вследствие этого, к более высокой скорости анализа. Электрофоретическая подвижность ионов μ связана со скоростью электрофоретического перемещения U и напряженностью поля E соотношением:

$$U = \mu \cdot E = L_{\text{eff}} / t$$

Здесь L_{eff} – эффективная длина капилляра (от входа до детектора), t – время перемещения.

Эта формула может быть преобразована с учетом равновесия сил, действующих на перемещающийся ион.

На отдельный ион действует сила K_B , ускоряющая его:

$$K_B = \frac{z \cdot F \cdot E}{N_A}$$

где F – константа Фарадея (96500 Кл/моль), z – эффективный заряд иона.

Эта сила приблизительно равна силе трения K_R , которая в соответствии с законом Стокса выражается уравнением:

$$K_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot U$$

При этом η – динамическая вязкость [Па·с], r – стоксовский радиус [см]. Скорость электрофоретического перемещения U тогда может выражаться как :

$$U = \frac{z \cdot F \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A}$$

Если затем накладывается напряжение (обычно от 10 кВ до 30 кВ) то происходит разделение за счет различной скорости перемещения пробы в разделительном буфере. При этом ионы перемещаются в электрическом поле со скоростью, которая может быть выражена следующим уравнением:

$$\mu = \frac{L_{\text{eff}}}{t \cdot E} = \frac{L_{\text{eff}} \cdot L_{\text{ges}}}{t \cdot U}$$

При расчетах важно различать общую длину капилляра (L_{ges}) и эффективную длину капилляра от места ввода пробы до детектора (L_{eff}). так как электрическое поле уменьшается на протяжении общей длины капилляра, а молекулы мигрируют лишь в пределах эффективной длины капилляра. Поэтому данные о длине капилляров характеризуются отношением длин в см $L_{\text{eff}}/L_{\text{ges}}$.

Электрофоретическое разделение возможно лишь тогда, когда ионы различаются по их подвижности. Эффективный заряд представляет собой заряд иона за вычетом части заряда окружающего противоположно заряженного двойного электрического слоя. При перемещении ион притягивает эту часть двойного электрического слоя и передвигается из-за этого более медленно. Это явление называется электрофоретическим эффектом, который наиболее сильно проявляется в тонких диффузных двойных слоях вокруг ионов. Этот характеристический двойной электрический слой может быть рассчитан по теории Дебая-Хюккеля. Он обратно пропорционален корню квадратному из концентрации электролита. Отсюда следует, что эффективный заряд иона и, соответственно, скорость перемещения при увеличении ионной силы уменьшаются.

Для крупных частиц с радиусом большим, чем размер двойного электрического слоя, подвижность частиц близкого состава не зависит от их размеров, что затрудняет разделение больших молекул при электрофорезе, поскольку скорость перемещения молекул ДНК и белков, денатурированных ДДСН, в чистом растворителе идентична. Разделение достигается лишь тогда, когда миграция обусловлена молекулярно-ситовым эффектом (например, в гелях).

4. Электроосмотический поток (ЭОП)

В то время как электрофорез обуславливает разделение частиц с различной подвижностью, электроосмос определяет течение буферного раствора в электрическом поле.

В большинстве случаев при капиллярном электрофорезе на электрофоретическое перемещение ионов накладывается ЭОП. Этот поток зависит от распределения зарядов вблизи поверхности капилляра. Почти все поверхности несут на себе определенный заряд. В случае кварцевых капилляров - это отрицательные заряды, обусловленные диссоциацией силанольных групп. Этот поверхностный заряд локализуется в жидкости напротив соответствующих противоионов с противоположным зарядом. В таком двойном электрическом слое, схематически изображенном на рис. 3, преобладают положительные ионы, которые распределены между неподвижными и подвижными слоями.

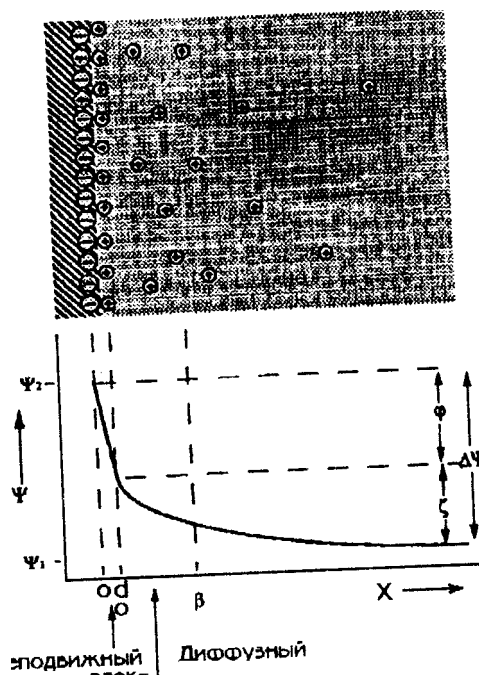


Рис. 3. Разделение зарядов на поверхности кварца и образование ξ -потенциала.

Если параллельно поверхности капилляра приложено электрическое поле, то оно притягивает противоионы из подвижного слоя вдоль оси и засасывает жидкость в капилляр. Поэтому в случае кварцевых капилляров электроосмотический поток направлен к катоду. Образуется очень плоский профиль потока. Это приводит к значительно меньшему уширению пиков, чем при гидродинамическом течении, при котором образуются сильно зависящие от радиуса капилляра и скорости течения параболические профили потока - профили Хагена-Пуазейля (рис. 4).

В капиллярах, загруженных стеклянными шариками или частицами силикагеля, ЭОП не должен зависеть от диаметра частиц, и направление потока в загруженном капилляре должно быть таким же, как и в пустом. При этом нет необходимости в применении очень маленьких частиц (с диаметром около 1 мкм или даже меньше) или длинных колонок, как при хроматографических методах. Поэтому метод ЭХ вызывает все возрастающий интерес, так как он сочетает селективность ВЭЖХ с высокой разделительной способностью КЭ. Благодаря применению непористых частиц можно исключить влияние диффузии в поры на уширение полос или пиков.

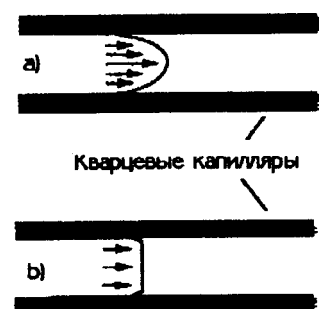


Рис. 4. Профиль ЭОП, обусловленный давлением (а), и идеальный профиль (b).

Величина ЭОП может быть упрощенно описана с помощью так называемого уравнения Гельмгольца.

$$u = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \xi}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

Она пропорциональна диэлектрической проницаемости ε , напряженности приложенного поля E и количеству зарядов на стенке капилляра или возникающему при этом ξ -потенциалу и обратно пропорциональна вязкости электролита η . В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических компонентов и возрастает с увеличением степени диссоциации поверхностных силанольных групп, что означает увеличение ЭОП с возрастанием значений pH (рис. 5). Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд (см. рис. 6), то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

Зависимость ЭОП в кварцевых капиллярах от значений pH и соответствующая воспроизводимость подвижности представлены на рис. 5. ЭОП проявляет при циклическом обмене буферов типичный эффект гистерезиса. Наибольшие отклонения наблюдаются в средней области pH при значениях, близких к значению pK кремневой кислоты. Благодаря увеличению времени кондиционирования в зависимости от изменений значений pH буфера удастся несколько уменьшить это отклонение, и явления гистерезиса уменьшаются. Для воспроизводимости работ с незагруженными капиллярами необходимо при обмене буферов стандартизовать время заполнения и кондиционирования с тем, чтобы можно было устранить явление гистерезиса ЭОП.

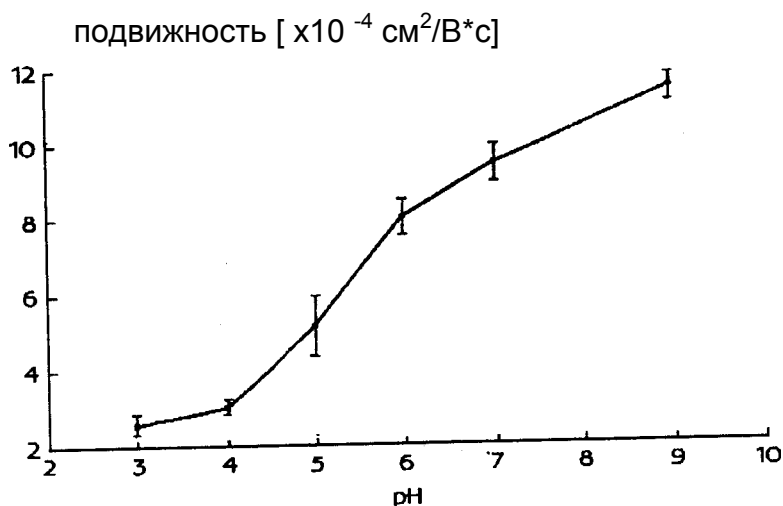
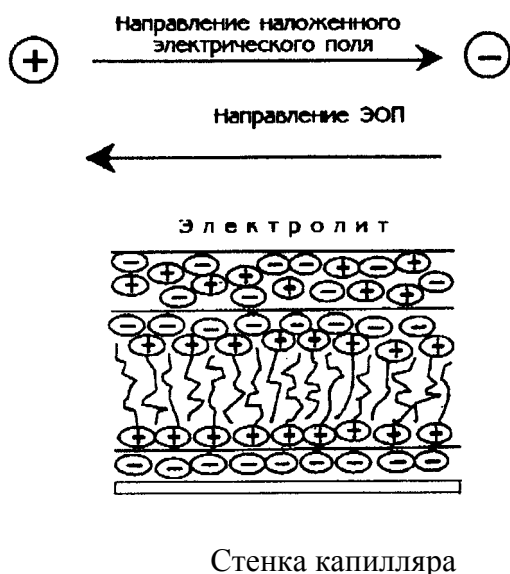


Рис. 5. Зависимость электроосмотического потока от pH. Условия: внутренний диаметр капилляра 75 мкм, $L=40/47$ см, буфер: фосфат 10 мМ, нейтральный маркер: бензиловый спирт; $E=425$ В/см.

Как уже упоминалось, ЭОП уменьшается по мере возрастания ионной силы. При этом зависимость ЭОП от логарифма концентрации буфера носит линейный характер (рис. 7).

ЭОП присутствует во всех электрофоретических методах разделения, так как никогда не удастся полностью исключить возникновение поверхностных зарядов. Он может привести, с одной стороны, к концентрационному перемещению электрофоретических зон, однако, с другой стороны, играет существенную и иногда решающую роль при переносе зон через капилляр. Из-за постоянно существующего ЭОП при капиллярном электрофорезе детектор во всех случаях располагается в непосредственной близости от катода.

Анионы сами переносятся к катоду, соответственно скорость их электрофоретического перемещения ниже, чем скорость ЭОП. Таким образом, ЭОП позволяет проводить разделение катионных и анионных соединений в одном анализе (сравни с рис. 2). При других методах капиллярного электрофореза (например, при мицеллярной электрохроматографии) ЭОП используется исключительно для переноса проб (частично незаряженных) к детектору.



Двойной
электрический
слой катионных
ПАВ

катион-

Рис. 6. Адсорбция катионных ПАВ на стенке капилляра.

Благодаря химической модификации поверхности капилляров, ЭОП может контролироваться, исключаться или даже обращаться. Определение значения ЭОП служит единственной возможностью определить изменения на поверхности капилляров, например, благодаря необратимой адсорбции компонентов пробы. Все другие методы характеристики поверхности капилляров исключаются при очень небольших поверхностях (1 см^2). Поверхностно-модифицированные капилляры не проявляют явлений гистерезиса при смене буферов и из-за незначительной адсорбции очень хорошо подходят для анализа белков (см. ниже).

За счет добавления длинноцепочечных катионных детергентов, таких как, например, цетилметиламмониевые соли, которые адсорбируются на силанольных группах поверхности, можно осуществить даже обращение ЭОП. При этом образуется двойной слой детергента, обращенный положительным зарядом в направлении электролита. При использовании капилляров с такими покрытиями удастся осуществлять разделение быстро перемещающихся неорганических ионов. Таблица 1 дает представление о возможностях влияния на ЭОП.

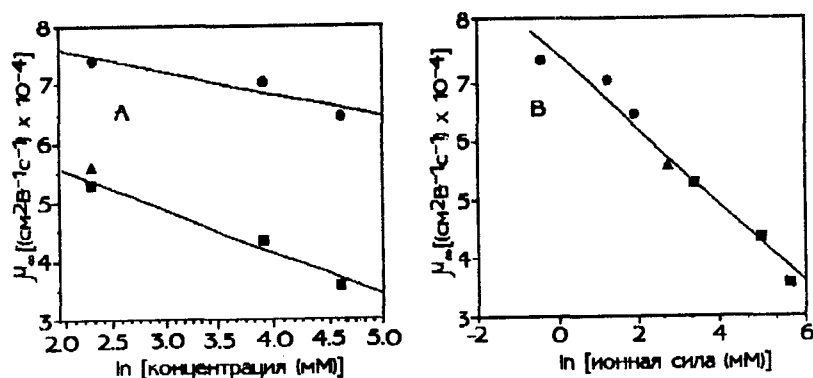


Рис 7. Концентрационная зависимость ЭОП. Условия: кружок - боратный буфер, квадрат - фосфатный буфер (в каждом случае рН 8.0). А: ЭОП в зависимости от $\ln$ концентрации буфера; В: ЭОП в зависимости от $\ln$ ионной силы буфера.

Таблица 1.

Возможности влияния на ЭОП.

Изменения в системе разделения	Воздействие на ЭОП	Примечание
pH буфера	ЭОП возрастает при уменьшении pH	Может также влиять на заряд пробы
Концентрация буфера	ЭОП возрастает при уменьшении концентрации буфера	Высокая концентрация обуславливает сильное течение, малая концентрация легко приводит к перегрузке
Температура	Изменяется вязкость (2 - 3% на 1°C)	Может также влиять на селективность
Органические растворители	Изменение ЭОП и вязкости	Комплексное изменение буфера разделительной системы, в большинстве случаев с изменением селективности
ПАВ как добавки к буферам или нейтральные гидрофобные полимеры	Адсорбция на стенке капилляра. Характерное изменение ЭОП	Анионные ПАВ могут увеличить ЭОП, катионные ПАВ уменьшают или обращают ЭОП
Динамические покрытия	При образовании мицелл сильное изменение селективности	Проблемы со стабильностью
Ковалентные покрытия	Влияют на ЭОП, уменьшают адсорбцию на стенках	Проблемы со стабильностью
Радиальное электрическое поле	Изменение ЭОП	Ограниченное распространение

Изменение концентрации буфера представляется наиболее эффективной и простой возможностью влиять на ЭОП разделительной системы. Чтобы оценить действие концентрации буфера на разделение, было проведено разделение тест-смеси, содержащей ионы с различными отрицательными зарядами в боратном буфере с концентрацией от 5 мМ до 100 мМ как при постоянном токе, так и при постоянном напряжении.

Результаты испытаний представлены на рис. 8 и 9. Благодаря этим измерениям было четко показано, что ЭОП увеличивается по мере уменьшения концентрации буфера и поэтому подходит для анализа сильно отрицательно заряженных, мигрирующих против ЭОП проб. При постоянном напряжении (10 кВ) и концентрации буфера 5 мМ бензолтрикарбоновая кислота еще может быть обнаружена, однако при том же самом времени анализа и концентрации буфера 50 мМ можно детектировать только бензойную кислоту. При этом ток повышается с 10 до 130 мА. Аналогичное поведение можно наблюдать для веществ, подвергаемых разделению при постоянном токе (100 мА). Работая с буфером 10 мМ при 26 кВ, в течение 8 минут можно обнаружить все четыре тестовых вещества, в то время как в буфере 50 мМ удается детектировать только нейтральный маркер (бензиловый спирт). В этом буфере при

максимальной силе тока 100 мА можно достигнуть напряжения лишь в 5.5 кВ. Если построить зависимость времени анализа от концентрации буфера, то можно отчетливо видеть параллельный ход кривых бензойной кислоты и бензилового спирта. Наивысшая скорость перемещения достигается при самой низкой концентрации буфера. Если рассчитать электрофоретическую подвижность бензойной кислоты, то она при различных концентрациях буфера остается постоянной, поэтому бензойная кислота может служить веществом-индикатором при качественном анализе.

Для уменьшения времени анализа или для анализа многозарядных анионов необходимо работать с буферами низкой концентрации и при щелочных значениях pH. Этот эффект представлен на рис. 10.

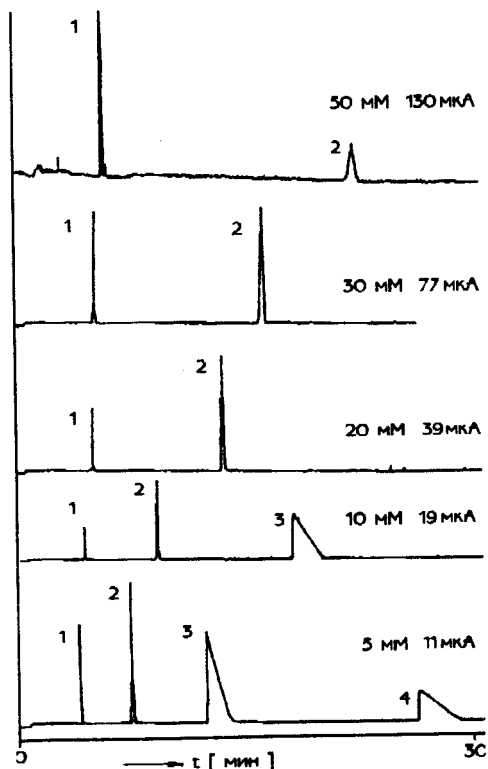


Рис. 8. Разделение тестовой смеси анионов при постоянном напряжении. Условия: прибор - Векстаа Р/АСЕ 2000; капилляр - 75 мкм, поле: 227 В/см; буфер - борат, pH 9.5; ввод пробы - давлением, 2 с.; детектирование - 214 нм; проба - бензоловый спирт (1), бензойная кислота (2), фталевая кислота (3), 1,3,5-бензолтрикарбоновая кислота (4).

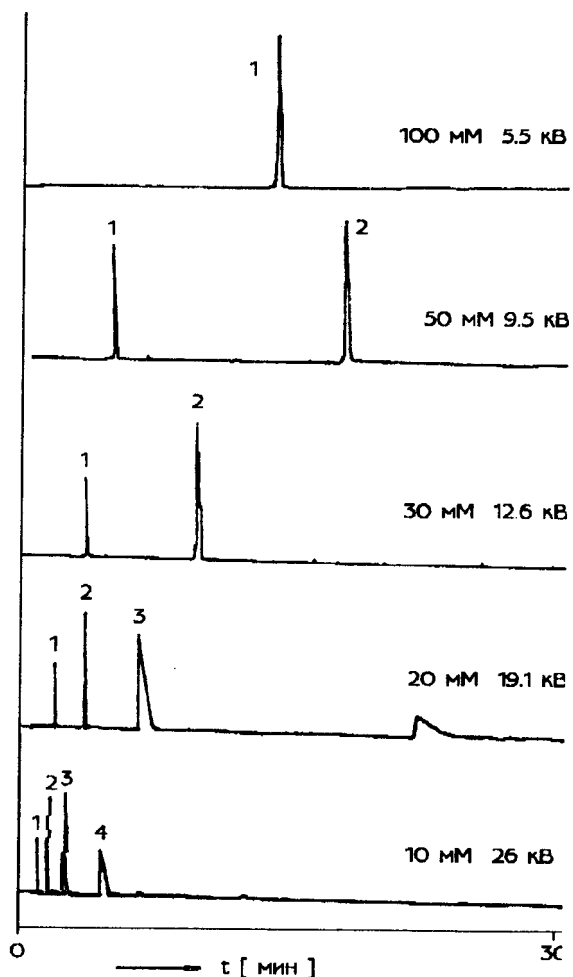


Рис.9. Разделение тестовой смеси анионов при постоянном токе. Условия: прибор - Векстаа Р/АСЕ 2000; капилляр - 75 мкм; поле - варьируется; буфер - борат, pH 9.5; ввод пробы - давлением, 2 с.; детектирование - 214 нм; проба - бензоловый спирт (1), бензойная кислота (2), фталевая кислота (3), 1,3,5-бензолтрикарбоновая кислота (4).

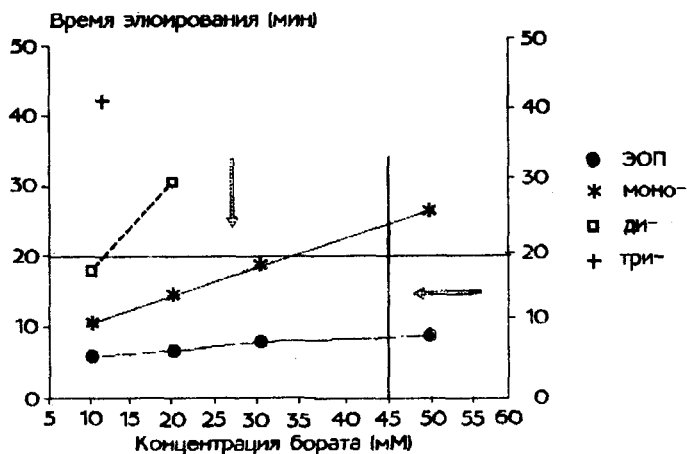


Рис. 10. Зависимость времени анализа от выбранной концентрации буфера. Условия аналогичны рис. 8.

5. Уширение полос

Для описания уширения полос в КЭ используют известные хроматографические величины, употребляемые также для описания переноса в капиллярах. Так, число теоретических тарелок рассчитывается по аналогии с хроматографическими методами из ширины пика и времени переноса.

Основной вклад в уширение полос при хроматографии в открытых трубках вносит профиль потока Хагена-Пуазейля. Этот вклад пропорционален квадрату диаметра капилляра и обратно пропорционален коэффициентам диффузии веществ в электролите (параметр C в уравнении Голя).

Профиль потока жидкости из-за медленной радиальной диффузии не выравнивается. По этой причине капиллярная жидкостная хроматография с диаметром капилляра > 50 мкм невозможна. При газовой хроматографии коэффициенты диффузии больше в 10^4 раз и параболический профиль потока быстро выравнивается вследствие радиальной диффузии. Поэтому капиллярная газовая хроматография является высокоэффективным методом разделения. Поскольку профиль потока в КЭ формируется с помощью ЭОП, вкладом профиля потока в уширение полос можно пренебречь, так что в идеальном случае во внимание принимается исключительно параметр продольной диффузии. По этой причине не нужно разделять, как это делается в ВЭЖХ, отдельные вклады в уширение полос на три составляющие: продольную диффузию, вихревую диффузию и составляющую массопереноса, так как в КЭ плохое разделение пиков вызвано преимущественно другими причинами, и лишь понятие продольной диффузии может быть позаимствовано из теории хроматографии.

5.1. Потеря эффективности вследствие диффузии

Если пренебречь в первом приближении другими причинами уширения полос, то оказывается, что число теоретических тарелок прямо пропорционально напряженности электрического поля E и обратно пропорционально коэффициенту диффузии D .

Определяя уравнение для числа теоретических тарелок и применяя закон диффузии Эйнштейна, получаем связь между важнейшими величинами: числом теоретических тарелок, напряженностью поля E и коэффициентом диффузии D .

$$N = \frac{L}{\sigma_L^2} \quad H = \frac{\sigma_L^2}{L}$$

$$\sigma = 2D \cdot t = \frac{2D \cdot L_{eff} \cdot L_{ges}}{\mu \cdot U}$$

где N - число тарелок, обратно пропорциональное уширению полосы H ,
 D - коэффициент диффузии вещества в разделительном буфере,
 U - напряжение,
 μ - скорость.

Число теоретических тарелок возрастает с увеличением напряжения и уменьшением коэффициента диффузии (в противоположность ВЭЖХ, где число тарелок с уменьшением коэффициента диффузии сильно уменьшается).

Коэффициенты диффузии различных веществ в водных растворах представлены в таблице 2. С увеличением молекулярной массы перенос веществ за счет диффузии замедляется и коэффициенты диффузии уменьшаются.

Гиддингс показал, что при комнатной температуре и в широкой области значений параметров уравнение для числа теоретических тарелок сводится к соотношению:

$$N=20 \cdot z \cdot U,$$

где z - эффективный заряд пробы в буфере.

Таблица 2.

Коэффициенты диффузии и молекулярные массы (ММ) различных веществ в водных растворах

Вещество	ММ [г/моль]	$10^{-5}D$ [см ² /с]
Ионы натрия	23	1.25
Этанол	46	1.08
Валин	117	0.74
Триптофан	204	0,61
Глюкоза	180	0.56
Цитохром С	13400	0.11
Сывороточный альбумин человека	68500	0.069
Фибриноген человека	340000	0.019
Вирус табачной мозаики	40590000	0.0046

При напряжении от 100 до 35000 В, а также эффективном заряде от 1 до 10 достигается величина до 10^7 теоретических тарелок на метр. Эта величина показывает, что в этом отношении КЭ превосходит ВЭЖХ.

Предсказанное высокое число теоретических тарелок было измерено в заполненных гелем капиллярах для молекул ДНК. Молекулы ДНК представляют собой особый случай, так как из-за большого числа отрицательных зарядов они не вступают в обменное взаимодействие с поверхностью капилляра. С белками достигнуть такого числа тарелок не удастся, хотя с покрытыми капиллярами можно получить до 10^6 тарелок на метр.

Необходимо заметить, что в хроматографии прохождение всех проб через детектор после элюирования на колонке и соответствующего разбавления всегда происходит с постоянной скоростью. Однако в КЭ с детектированием в колонке скорость перемещения проб к окну детектора различна. Только поэтому возможно выравнивание достижимого числа теоретических тарелок в ВЭЖХ и в КЭ.

Для практического расчета числа теоретических тарелок можно использовать ширину пика на половине высоты и время удерживания (время выхода пика). В этом случае число теоретических тарелок рассчитывается по формуле:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t}{b} \right)^2$$

t - время удерживания вещества (выхода пика), b - ширина пика на половине высоты.

На практике кроме продольной диффузии в КЭ существуют другие эффекты, которые способствуют уширению пиков. К этим причинам уширения полос в КЭ относятся:

- адсорция пробы стенками капилляра,
- искажение плоского "поршневидного" профиля потока из-за температурного эффекта,
- наложение электроосмотического потока,

- слишком длинная зона ввода пробы,
- слишком большая концентрация пробы,
- разница в подвижностях буфера и анализируемых ионов.

Как и в ВЭЖХ, в КЭ имеет место аддитивность дисперсий (σ^2) при совместном действии различных причин, приводящих к суммарному уширению полос. В итоге это приводит к уменьшению числа теоретических тарелок N или, соответственно, к увеличению значения H .

$$\sigma^2 = \sigma_{VU}^2 + \sigma_{MU}^2 + \sigma_{LD}^2 + \sigma_{DE}^2 + \sigma_{WA}^2 + \sigma_T^2 + \sigma_{\Delta\mu}$$

σ^2 - дисперсия пика при гауссовой форме, индексами обозначены причины дисперсии:

VU - перегрузка по объему, MU - перегрузка по массе, LD - продольная диффузия, DE - детектирование, WA - адсорбция на стенках, T - температурные эффекты, $\Delta\mu$ - разница в подвижности иона пробы и буфера.

Впоследствии мы остановимся на некоторых из этих причин более подробно. Особый интерес при этом будут представлять прежде всего эффекты перегрузки, ионной силы буфера, адсорбции на стенках, температурные эффекты и разница в подвижности ионов пробы и буфера.

5.2. Потеря эффективности в результате температурных эффектов

В результате наложения поля в капилляре протекает электрический ток. Этот ток, помимо других причин, зависит от удельной проводимости буфера и диаметра капилляра. Приведенная ниже формула описывает связь между мощностью электрического тока и некоторыми характеристиками процесса разделения.

$$P = U \cdot I = R \cdot I^2 = U^2 \cdot d^2 \frac{\pi \cdot k}{2L}$$

где P - мощность,

d - внутренний диаметр капилляра,

k удельная электропроводность буфера.

Из уравнения видно, что мощность зависит от квадрата напряжения и квадрата радиуса капилляра. Например, при удвоении внутреннего диаметра капилляра напряжение уменьшается в два раза. При этом мощность остается постоянной. Поэтому время анализа при использовании капилляра большого диаметра выше.

Отвод тепла, выделяемого за счет электрической мощности, происходит исключительно через стенки капилляра, так что в буфере возникает радиальный температурный градиент, а с ним и градиент вязкости, перпендикулярный электрофоретическому потоку. При этом тепло будет отводиться через различные материалы с различной скоростью.

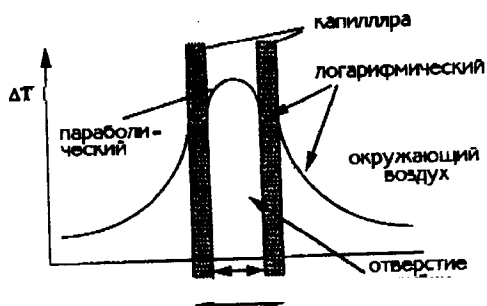


Рис. 11. Градиент температуры в буфере для разделения и на стенках капилляра.

В то время как вода обладает относительно высоким тепловым сопротивлением ($6.0 \cdot 10^{-3}$ Вт/см К), через кварц тепло будет отводиться быстро (тепловое сопротивление $1.4 \cdot 10^{-2}$ Вт/см К). Типичное значение для разницы температур между внутренними и внешними стенками капилляра лежит в интервале между 0.3 и 0.7 °С.

Как показывают расчеты, при этом образуется параболический температурный градиент. Середина капилляра нагревается наиболее сильно, и температура здесь

может быть на 10 °С выше, чем на внутренней стенке капилляра. Радиальный температурный градиент вызывает градиент вязкости, который оказывает влияние на профиль потока. Поэтому вещество перемещается медленнее в зоне с высокой вязкостью (стенки капилляра), чем в зоне с меньшей вязкостью (середина капилляра). Образование температурного градиента сильно зависит от размеров капилляра, электропроводности буфера и охлаждения капилляра. Охлаждение капилляра усиливает температурный градиент, однако оно необходимо для того, чтобы избежать дегазации и локального перегрева. Различие в вязкости между серединой капилляра и стенками приводит к различию переноса и, как следствие, к уширению полос и потере эффективности разделения.

Влияния радиальных градиентов температуры и вязкости можно избежать только за счет уменьшения диаметра капилляра.

Разница в температуре между серединой капилляра и стенками в цилиндрической трубке возрастает пропорционально квадрату диаметра капилляра. Поэтому в КЭ применяют очень тонкие капилляры (диаметром от 50 до 100 мкм). Сам градиент температуры не может быть измерен из-за очень малых размеров капилляра. При уменьшении диаметра оптическая плотность слоя и, вместе с тем, чувствительность обнаружения уменьшаются (закон Ламберта-Бера). Другая возможность уменьшения влияния джоулева тепла состоит в снижении концентрации буфера и/или применении буфера с низкой ионной электропроводностью.

Так как повышение температуры увеличивает электропроводность буфера в капилляре, ток при постоянном напряжении в начале анализа изменяется до тех пор, пока не образуется стабильный температурный градиент. В этом состоянии основное джоулево тепло отводится через стенки капилляра. При неэффективном охлаждении температура буфера повышается, и поэтому ток увеличивается непропорционально приложенному напряжению. При этом перестает выполняться закон Ома.

В целом действием температурных эффектов можно пренебречь при работе в области выполнения закона Ома. Максимальное необходимое напряжение зависит, таким образом, от диаметра капилляра, электропроводности буфера и эффективности охлаждения.

Как ясно видно из рисунка, применение капилляра с очень маленьким внутренним диаметром позволяет повысить электрическое сопротивление, при этом одновременно увеличится линейная область U/I -кривой. Так, к примеру, с исследуемым буфером (рис. 12 А) в капилляре с внутренним диаметром 50 мкм можно работать до 25 кВ. В то же время для капилляра диаметром 100 мкм рабочая область не превышает примерно 12 кВ.

Можно повысить электрическое сопротивление, применяя цвиттер-ионный буфер. Уменьшая удельную электропроводность, можно, как показано на примере буфера, содержащего циклогексиламинопропановую кислоту (ЦАПК), работать вплоть до 20 кВ даже с капилляром, имеющим внутренний диаметр 100 мкм.

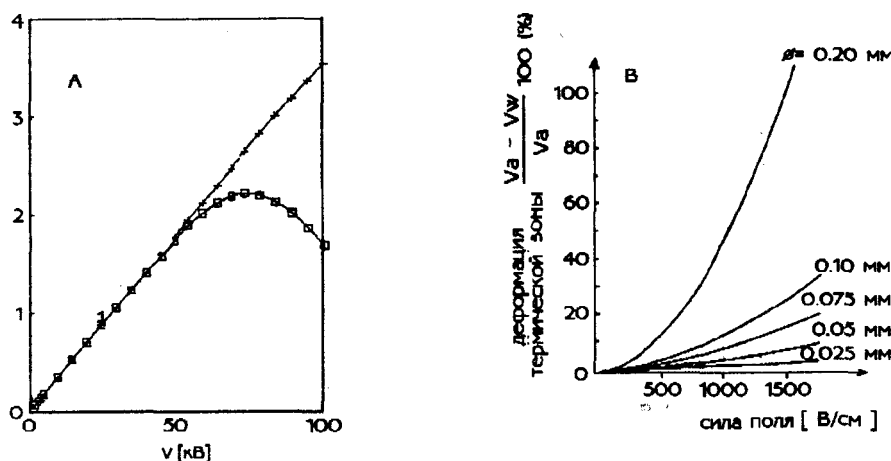


Рис. 12. А: Достигаемое число теоретических тарелок в капиллярном электрофорезе с учетом и без учета джоулева тепла. В: Зависимость уширения полос вследствие температурного эффекта от напряженности

поля при различных диаметрах капилляра.

5.3 Потеря эффективности в результате электрической дисперсии

Уменьшение электропроводности буфера устанавливает, однако, некоторые ограничения. Если между электропроводностью в буфере и в зоне пробы существует большое различие, то локальное нарушение электрического поля приводит к искажениям зон и, вследствие этого, к уменьшению эффективности разделения. Если электропроводность внутри зоны пробы больше, чем в несущем электролите, то уменьшение сопротивления приводит к снижению напряженности поля. Из-за этого молекулы пробы в зоне концентрационного максимума перемещаются медленнее, чем на краях. Это приводит к сильному искажению зон с медленным подъемом и быстрым падением в них концентрации веществ. В другом случае возникает пик с большим "хвостом". Симметричный пик получается только, если электропроводности в зоне пробы и в буфере одинаковы.

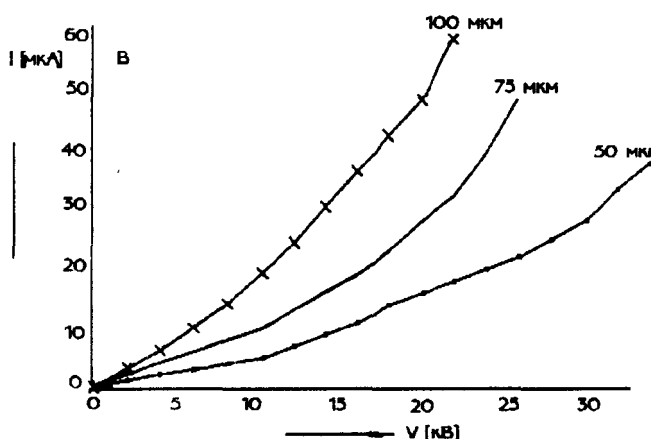


Рис. 13. Увеличение силы тока в зависимости от напряжения и внутреннего диаметра капилляра. Условия: прибор для КЭ - МП-lipore Quanta 4000; капилляр - 360 мкм (внешний диаметр), 50/56 см; буфер (А): 20 мМ борат, рН 10.0; буфер (В): 25ММ ЦАПК. рН 11,0.

Поэтому концентрацию буфера необходимо подбирать применительно к конкретной проблеме разделения (диссоциация и подвижность пробы). Кроме того, разница в подвижности между ионами пробы и буфера может привести к изотахофоретическому эффекту. Это дает в большинстве случаев треугольную форму пика, которая вызывает проблемы при интегрировании.

При этом, если электропроводность зоны пробы больше, чем у разделительного буфера, это приводит к разбавлению пробы при ее вводе. Это объясняется законом Кольрауша, который требует постоянной электропроводности на всем участке разделения.

$$\omega(x) = \sum_{i=1}^n \frac{c_i \cdot z_i}{\mu_i} = const$$

i - ионы в зоне разделения,

ω_i - функция Кольрауша.

Если при этом существует еще и разница в подвижности между ионами пробы и буфера, то происходит искажение формы пика. Эта сложная взаимосвязь наглядно обобщена еще раз в таблице 3.

Электропроводность буфера в зонном электрофорезе должна быть одинаковой на всем участке разделения. Только этим обеспечивается то, что напряжение на участке разделения падает равномерно и скачков напряженности поля не возникает.

Таблица 3

Взаимосвязь между формой пика и подвижностью, а также между электропроводностями раствора (χ_s) и буфера (χ_p)

	$\chi_s > \chi_p$	$\chi_s = \chi_p$	$\chi_s < \chi_p$
$\mu_s < \mu_p$	Разбавление Пики с "хвостами"	Разбавление Пики с "хвостами"	Концентрирование Пики с "хвостами"

$\mu_s = \mu_p$	Разбавление Симметричные пики	Нет влияния Симметричные пики	Концентрирование Симметричные пики
$\mu_s > \mu_p$	Разбавление Фронтальные пики	Фронтальные пики	Концентрирование Фронтальные пики

Появление градиента напряженности электрического поля в зоне перемещения молекул пробы определяется ионной силой (или концентрацией) буфера. Если электропроводностью зоны пробы нельзя пренебречь по сравнению с электропроводностью буфера, это приводит к уширению полос. Эффект усиливается с ростом различия в подвижностях ионов пробы и буфера.

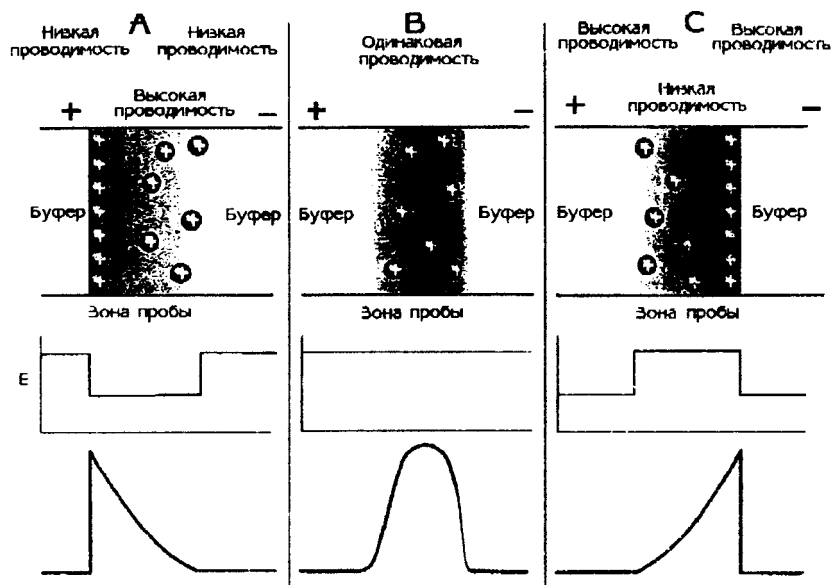


Рис. 14. Схематическое объяснение уширения полос из-за электрической дисперсии.

Из-за скачка напряжения на границе пиков происходит деформация и образуются крутой и пологий края пика. На рис 15 представлена зависимость значений N от концентрации боратного буфера для четырех соединений. Значения N при этом для всех веществ с увеличением концентрации буфера снизились, например, для (1-гидроксibenзойной кислоты с 31 мкм до 4 мкм.

Для ионов пробы с большим отличием в подвижности от ионов буфера значение N на несколько порядков выше, чем в случае пробы, имеющей подвижность такую же, как у ионов буфера.

Эти явления более подробно рассмотрены в главе "Непрямое УФ-детектирование", поскольку при этом способе детектирования часто необходимо использовать маленькие концентрации буфера.

Рассмотрим эти проблемы на примере разделения гомологического ряда карбоновых кислот.

В то время как низшие гомологи детектируются с отчетливым искажением, каприловая кислота выходит в виде симметричного пика. Карбоновые кислоты, перемещающиеся медленнее, обладают значительно меньшей подвижностью, чем ионы буфера, и поэтому детектируются в виде асимметричных пиков с увеличивающимися "хвостами".

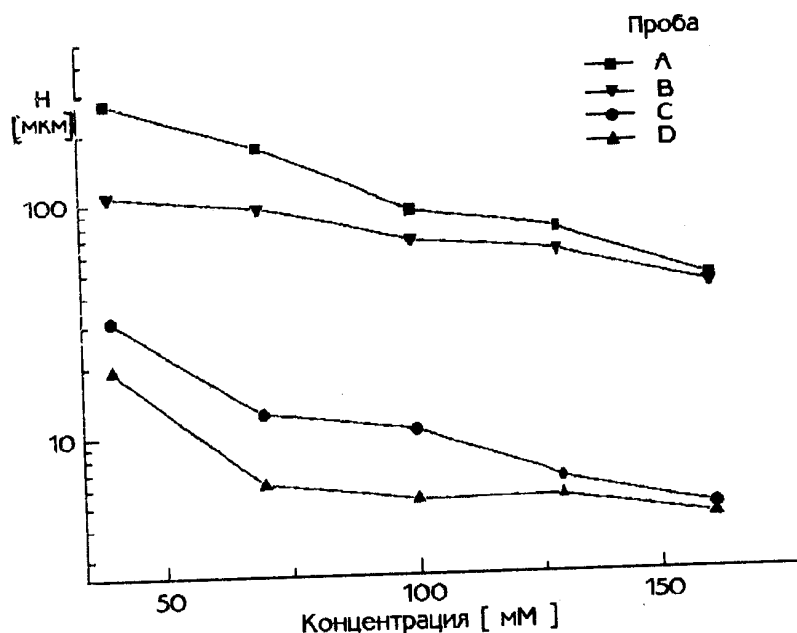


Рис. 15. Влияние концентрации буфера на уширение полос. Условия: прибор для КЭ - Beckman P/ACE 2000; капилляр - 50 мкм, 54/51 см; поле • 400 В/см; буфер: борат, рН 8.5; ввод пробы - давлением, 1 с.; детектирование - 214 нм: А - фенилтриметиламмонийхлорид, В - фталевая кислота, С - п-гидроксibenзойная кислота, D - бензиновый спирт.

5.4. Адсорбция на стенках

Молекулы пробы могут адсорбироваться на стенках за счет взаимодействия с отрицательно заряженными силанольными группами кварца. При нейтральных и щелочных условиях разделения многие силанольные группы депротонируются и способствуют адсорбции положительных ионов пробы на стенке. В результате этого ξ -потенциал, образовавшийся на поверхности кварца, изменяется и, как следствие, изменяется подвижность электроосмотического потока, из-за чего происходит изменение времени выхода всех пиков. Кроме этого, из-за сильной адсорбции молекул пробы на стенках капилляра уменьшается интенсивность пика и это приводит в экстремальном случае к асимметричным пикам с большими "хвостами". Обработка таких пиков трудна, а часто невозможна.

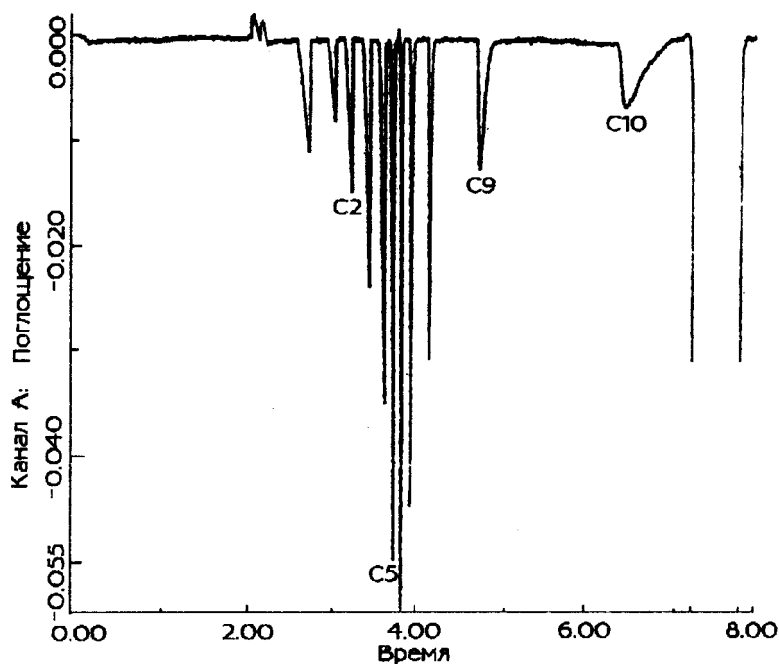


Рис. 16. Влияние разницы в подвижности между ионом пробы и ионом буфера на форму пика. Условия разделения: L=50/57 см; внутренний диаметр - 75 мкм; буфер - 5 мМ динитробензойная кислота, 0.5 мМ ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид) рН 9.0; E=-431 В/см; детектирование - не прямое, УФ 214 нм; проба - карбоновые кислоты по 25 ppm каждой.

Из-за локальных воздействий на поверхностный потенциал кварца следует ожидать дополнительного изменения профиля потока, который отклоняется от

идеальной "поршнеобразной" формы, что также способствует уширению полос. Особенно отчетливо можно наблюдать это явление в пробах, содержащих многозарядные положительные ионы. Вследствие повышения концентрации буфера ионообменное взаимодействие между пробой и силанольными группами подавляется, благодаря чему анализ становится возможным.

Особенно важным становится подавление адсорбции на стенках при разделении белков с помощью КЭ. В этом случае можно показать, что уже повышение емкостного отношения (как меры адсорбции на стенках) с 0.001 до 0,1 приводит к росту высоты эквивалентной теоретической тарелки (ВЭТТ) с 0.5 мкм до 15 мкм.

При повторных вводах растворов, содержащих белок, часто наблюдается изменение времени выхода. Для раствора проблема решается в основном двумя различными способами. Согласно первому можно связать ковалентно с поверхностью капилляра гидрофильный слой, второй состоит в возможности добавления к разделительному буферу веществ, которые препятствовали бы ионному обмену.

В представленном на рис. 17 примере разделения белков ионообменное взаимодействие между стенками капилляра и молекулами белка подавляется введением в буфер добавок ДАП (1,3-диаминопропана). Из-за экранирующего действия ДАП пик лизоцима при повышении концентрации ДАП всегда симметричен, и при этом даже возрастает высота пика.

С улучшением симметрии пиков, обусловленным малой адсорбцией на стенках, сильно уменьшается разбавление веществ и пик становится выше. Поэтому снижения границы обнаружения можно добиться не только улучшая детектирование, но также в значительной мере за счет сокращения уширения полос. Этот пример ясно показывает, что только для пиков с высокой интенсивностью (малым разбавлением) достигается низкий порог обнаружения.

Из-за высокой концентрации добавок электропроводность буфера становится такой большой, что для разделения белков можно применять поле только небольшой напряженности, что ведет к удлинению времени анализа.

Устранение адсорбции на стенках будет более подробно описано в разделе, посвященном разделению белков.

5.5. Перегрузка системы разделения

Явление перегрузки наблюдается тогда, когда в систему разделения вводится слишком большое количество пробы. Так как в КЭ нет стационарной фазы, а разделительный объем ограничивается несколькими мкл, легко наступает явление перегрузки. Прежде всего, к перегрузке может привести неправильная регулировка прибора или слишком большая концентрация пробы. В качестве рабочего правила можно принять, что пробой может быть заполнено максимум 1-2% от объема капилляра. Для капилляра длиной 50 см это соответствует максимальной длине зоны пробы 10 мм.

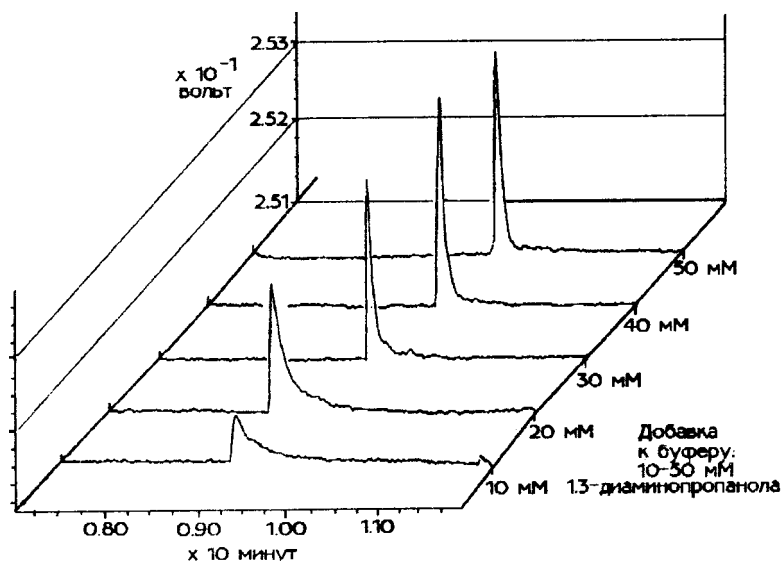


Рис. 17. Уширение полос из-за адсорбции на стенках.. Условия: капилляр - 50 мкм; 42/50 см; поле - 300 В/см; буфер - 50 мМ фосфат, 20 мМ сульфат лития, 10-50 мМ ДАП; рН 3.5; ввод пробы давлением, 1 с.; детектирование - 214 нм; проба - 0,5 мг/мл лизоцим.

Наряду с объемной

перегрузкой в случае слишком больших времен ввода при высокой концентрации пробы наблюдается также перегрузка по массе. Перегрузка по массе отчетливо видна при рассмотрении зависимости значения N от концентрации пробы. При равном времени ввода проб увеличивается только количество введенной пробы, а не ее объем. Доля σ_{vu} как вклада в уширение полос остается при этом постоянной. В качестве примера на рис. 18 показан эффект перегрузки из-за большого объема и высокой концентрации пробы.

Время ввода пробы повышается с 1 до 5 с, так что, хотя порог обнаружения и понижается примерно до 0.2 мМ, одновременно возрастает значение N , поэтому вклад перегрузки по объему увеличивается. Отсюда видно, что вкладом перегрузки по объему в уширение полос пренебречь нельзя. Даже при маленькой концентрации в области, в которой можно пренебречь перегрузкой по массе, значение N остается при вводе пробы за 5 с больше, чем при вводе за 1 с.

Низкий порог обнаружения при вводе больших объемов пробы нивелируется сильным уширением полос (таблица 4) и связанными с этим трудностями разделения соседних пиков.

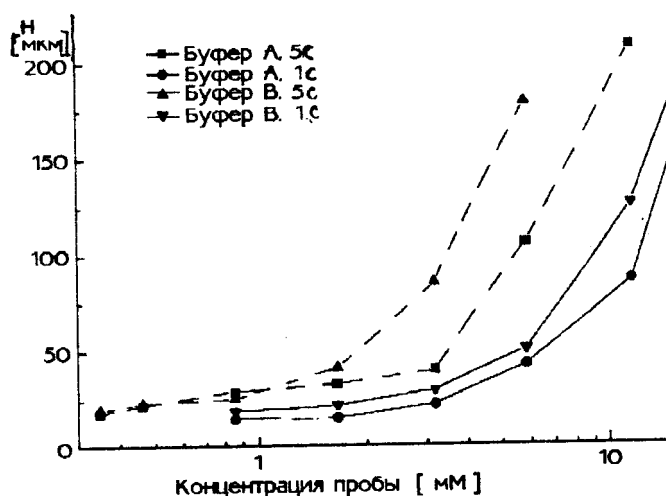


Рис. 18. Эффект перегрузки из-за большого объема и концентрации пробы. Условия: прибор для КЭ - Вексман Р/АСЕ; капилляр - 75 мкм, 65/72 см; поле - 347 В/см; буфер А - 70 мМ борат, рН 8.5; буфер В - 40 мМ борат, рН 8.5; ввод пробы давлением, 1 или 5 с; проба - фенилтриметидаммонийхлорид.

Таблица 4

Рассчитанное влияние длины вводимой зоны пробы на уширение полос

Длина вводимой зоны [мм]	N для $D=10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$	N для $D=10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$
1	238000	1400000
2	164000	385000
10	81000	112000

5.6. Наложение профилей потока

При разделении в КЭ всегда надо обращать внимание на то, чтобы не было разницы в уровнях между обоими сосудами с электролитом. Даже при незначительной разнице уровней в капилляре возникает течение, которое приводит к параболическому профилю потока. Этот эффект вызывает дополнительный вклад в уширение полос и сильно зависит от радиуса капилляра. В то время как в случае капилляра с внутренним диаметром 25 мкм этим эффектом можно практически пренебречь, в капилляре диаметром 100 мкм этот эффект сильно ухудшает эффективность разделения и оказывает влияние на разрешение пиков.

5.7. Резюме

Важнейшие причины уширения полос в КЭ представлены в таблице 5.

Основные причины уширения полос

Причина уширения полос	Примечание
Продольная диффузия	Соответствует теоретическому пределу; увеличивается с уменьшением ММ и с увеличением времени анализа
Термические эффекты	Приводят к конвекции и к локальным изменениям вязкости буфера
Длительность ввода пробы	Должна быть меньше, чем зона, возникающая в результате диффузии: может увеличиваться для того, чтобы снизить порог обнаружения.
Адсорбция пробы на стенках	Причина появления пиков с "хвостами" и плохой воспроизводимости времени миграции
Электродисперсия (различие в подвижностях)	Причина треугольной формы пиков
Различие в уровнях жидкости	Гидродинамический поток с соответствующим профилем потока

6. Аппаратура

Аппаратура для КЭ появилась в продаже с 1988 года, количество предложений постоянно растет. Отдельные приборы принципиальных различий не имеют, так как сами системы разделения очень просты. Различия связаны с вводом пробы, а также числом и видом предлагаемых детекторов. Здесь не дается обзор рынка, а приводятся только типичные требования, предъявляемые к различным элементам аппаратуры.

Обзор рынка дается в журнале Nachr. Tech. Lab. (март 1993).

6.1. Источники напряжения

Напряжение должно регулироваться в области от -30 кВ до +30 кВ и при заданном значении по возможности оставаться постоянным. Максимально допустимый ток составляет 250 мкА, применение существенно больших значений на практике нецелесообразно. Кроме того, оказалось выгодным, если или напряжение, или ток могли бы поддерживаться постоянными независимо друг от друга. Автоматическая переполюсовка источника напряжения необходима только тогда, когда последовательность проб нужно обработать с помощью различных методов анализа и с применением по-разному ориентированного электрического поля.

Запись кривых напряжения и тока может указать на случайные нарушения во время анализа и быть полезной при поиске ошибок. В коммерческих приборах источник высокого напряжения автоматически отключается при открывании емкости, в которой происходит анализ, так что несчастные случаи исключаются. В приборах собственной конструкции, а также в коммерческих модульных приборах КЭ также обязательны меры предосторожности.

6.2. Капилляры

В КЭ обычно применяются кварцевые капилляры диаметром от 50 мкм до 100 мкм. В принципе возможно также применение стеклянных и пластиковых капилляров, которые, однако, не обладают достаточной проницаемостью в коротковолновой УФ-области,

Полиамидный слой кварцевого капилляра перед применением должен быть удален на месте детектирования механически или с помощью выжигания. С недавних пор в продаже появились также капилляры с покрытиями, проницаемыми для УФ-лучей. В большинстве случаев используются необработанные и немодифицированные капилляры. Кварцевые капилляры разных фирм различаются по точности непостоянству внутреннего диаметра, а также обработке внутренней поверхности и оптической проницаемости в области коротких волн. По этой причине для полного гидроксирования поверхности новые капилляры перед их первым употреблением должны обрабатываться в течение 10 минут 1 М раствором NaOH и затем выдерживаться примерно 20 минут в разделительном буфере.

Наиболее дешевыми являются капилляры, которые предлагаются различными фирмами-производителями на метры. Цена их в настоящее время около 10 марок ФРГ за метр. Существенно дороже капилляры, которые продаются поштучно готовыми к употреблению. Цена здесь колеблется в зависимости от типа капилляра (с покрытием или без, с ячейкой детектора или без и т.д.) и находится в пределах от 100 до 400 марок ФРГ за капилляр.

При подготовительной работе, связанной с установкой капилляров, отрезанных самостоятельно, необходимо контролировать место среза. Только ровное место среза гарантирует безупречный ввод пробы.

Для изготовления окна для детектирования имеются две возможности: во-первых, полиимид может выжигаться, во-вторых он может удаляться с помощью концентрированной кислоты (время обработки около 1 часа). Выжигание можно осуществить просто нагретой до красного каления проволокой. Этот метод однако не следует применять для капилляров, модифицированных покрытием внутри.

Соскабливание (лезвием бритвы) полиимида довольно трудно, и при этом можно разбить капилляр.

Модификация поверхности капилляра может достигаться теми же методами, которые описаны для модификации силикагеля с целью получения стационарной фазы для ВЭЖХ или для покрытия капиллярных колонок в ГХ. Как уже отмечалось ранее, для характеристики модифицированной поверхности капилляра применяется в основном изменение ЭОП. Иногда применяется также газохроматографический метод.

Преимущества и недостатки модифицированных капилляров обсуждаются в конкретных методиках разделения, в которых используются эти капилляры. То же самое относится к капиллярам, заполненным гелем.

В КЭ типичный вводимый объем находится в пределах между 2 и 20 нл, так что при объеме пробы 1 мкл возможно многократное впрыскивание. Раствор пробы после анализа с помощью КЭ может использоваться для дальнейших исследований. В таблице 6 представлены вводимые объемы вместе с другими важными характеристиками системы разделения. Объем рассчитывался для введенной зоны пробы длиной 1 мм в капилляре с внутренним диаметром от 250 до 25 мкм. Вводимый объем в используемых капиллярах с внутренним диаметром 75 мкм составляет около 5 нл, что соответствует от 0.5 до 2 ppm от объема пробы 1 мкл.

Таблица 6.

Характеристики капилляра

Внутренний диаметр [мкм]	Вводимый объем при длине 1 мм [нл]	Объем капилляра при длине 1 м [мкл]	Относительное сопротивление [%]	Поверхность на метр [ММ ²]	Отношение поверхность/объем [1/мкм]
250	49,4	49,4	625	785	11
160	20,1	20,1	256	502	25
100	7,9	7,9	100	314	40
75	4,4	4,4	56	236	54
50	2,0	2,0	25	157	79
25	0,5	0,5	6	79	158

Помимо вводимого объема, важным параметром разделительной системы является также сопротивление капилляра. Эта характеристика была занесена в табл. 6 как отношение сопротивления данного капилляра к сопротивлению капилляра с внутренним диаметром 100 мкм. Из таблицы также видно, что сопротивление при уменьшении внутреннего диаметра от 100 мкм до 50 мкм падает до 25% от первоначального значения. Это означает, что при идентичных экспериментальных условиях джоулево тепло уменьшается на четверть. Поскольку удваивается также отношение поверхности к объему, возникающее тепло будет легче отводиться. Вот почему для разделения выгодно использовать узкие капилляры. Однако имеются также и два осложняющих обстоятельства: во-первых, при этом уменьшается толщина слоя при УФ-детектировании в режиме реального времени и поэтому снижается чувствительность детектирования, во-вторых, возрастает время, необходимое для обновления разделительного буфера.

Таблица 7

Теоретическая оценка времени, необходимого для замены буфера в капилляре, в зависимости от внутреннего диаметра капилляра.

Внутренний диаметр капилляра [мкм]	Время для промывки определенным объемом (около 100 мкл)	Время для промывки 5-кратным объемом капилляра
160	1 мин	1 мин
100	6 мин 33 с	2 мин 34 с
75	20 мин 43 с	4 мин 33 с
50	1 час 44 мин 51 с	10 мин 14 с
25	1 день 3 часа 57 мин 43 с	40 мин
10	45 дней 12 часов 16 мин	4 часа 16 мин
5	2 года 4 часа 16 мин	17 часов 4 мин

Времена относятся к буферной системе с вязкостью воды, капилляру длиной 1 м и разнице давлений около 0.5 бар. Причина сильного увеличения времени промывки заключается в зависимости потока от внутреннего диаметра капилляра, которая формулируется законом Хагена-Пуазейля:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot r^4 \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

В таблице 7 приведены времена, которые необходимы для промывки капилляра определенным объемом (колонка 2) или объемом, в несколько раз превышающим объем капилляра (колонка 3). Времена, рассчитанные в этой таблице, дают также представление о зависимости времени ввода при вводе зон пробы одинаковой длины и, соответственно, одинаковых объемов в капиллярах с различным внутренним диаметром. Если, например, мы будем вводить в капилляр диаметром 50 мкм такой же объем пробы, как в капилляр диаметром 100 мкм, то время ввода будет в 16 раз больше. Если же будем вводить зоны пробы одинаковой длины, необходимо по крайней мере еще 4-х кратное время ввода.

6.3. Ввод пробы

Таблица 8.

Сопоставление способов ввода пробы для КЭ.

	Электро- кинетический ввод	Гидростатический ввод	Гидродина- мический ввод	Ввод дроблением пробы
Движущая сила ввода пробы	Электрическое поле	Сифон-эффект	Давление или вакуум	Электрическое "дробление" пробы и система "расщепления"
Автомати- зация	да	да	Да	нет
Минимальное количество пробы	<2,0 мкл многократный ввод	<2,0 мкл многократный ввод	2,0 мкл многократный ввод	>10 мкл с помощью дозировочного капилляра или ВЭЖХ-шприца многократный ввод пробы невозможен
Побочные эффекты при вводе пробы	да	нет	нет	да (для электрического "дробления") нет (для системы "расщепления" потока)
Относи- тельное средне- квадратичное отклонение	4,1%	<2,9%	2-3% (опытная величина)	<3% (идеальный случай для электрического "дроб- ления", 2% (для системы "расщепления" потока)

Воспроизводимый ввод пробы представляет в КЭ наиболее сложную проблему. Для того, чтобы не вызвать уширения полос, зона пробы должна быть мала. Поэтому необходимо вводить очень маленький объем пробы - от 5 до 50 нл. Слишком большой объем пробы очень быстро приводит к искажению пика и ухудшению разделения. Чтобы отвечать этим высоким требованиям, а также для облегчения работы со столь малыми объемами, необходима миниатюризация и автоматизация ввода пробы.

Воспроизводимый ввод маленьких объемов пробы является важной предпосылкой для количественного анализа и стандартизации отклонений. Важнейшие способы ввода пробы, которые находят применение в различных автоматизированных коммерческих приборах, представлены в табл. 8.

6.3.1. Ввод пробы давлением

Ввод пробы обеспечивается созданием разницы давлений между сосудом для пробы и концом капилляра, при этом давление либо повышается в сосуда для пробы, либо снижается на конце капилляра. Обе эти возможности допускают также простую промывку капилляра свежим буферным раствором. Количество вводимой пробы рассчитывается по соотношению:

$$Q = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t_i \cdot c}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

и зависит только от разницы давлений и времени ввода пробы. При временах ввода порядка нескольких секунд разность давлений лежит в области нескольких миллибар. В коммерческих приборах это наиболее распространенный способ ввода проб.

Проблему при этом методе ввода пробы составляет сжимаемость газа. Схема на рис. 19 поясняет эту проблему. Во-первых, выбранное для ввода давление должно быстро достигаться, во-вторых, падение давления после ввода пробы не должно быть резким. Поэтому полезно использовать в работе интеграл давление-время.

Относительное стандартное отклонение, по нашим оценкам, лежит в интервале между 2% и 3%; применяя внутренний стандарт можно уменьшить эту величину до 1% и ниже.

Для определения вводимого объема существуют две принципиальные возможности. Во-первых, это удастся сделать с помощью расчета, во-вторых, его легко можно контролировать посредством измерения. Расчет вводимого объема базируется на законе Хагена-Пуазейля и сильно зависит от параметров, которые обычно известны. В качестве примера можно назвать вязкость, а также радиус капилляра. Колебание радиуса капилляра только на 1% вызывает очень большую ошибку в расчетах, поскольку в законе Хагена-Пуазейля радиус входит в четвертой степени.

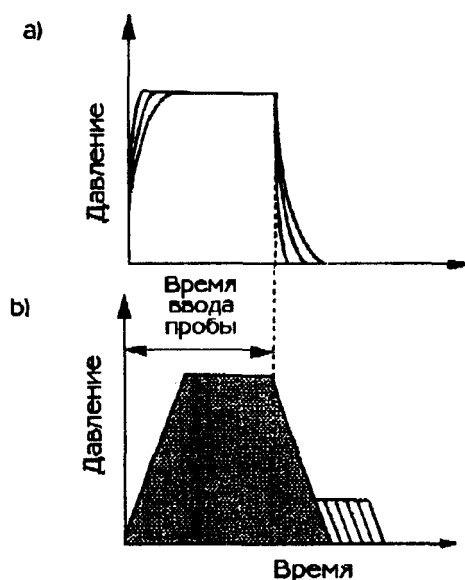


Рис. 19. Кривая давление-время при вводе проб: а) неконтролируемое повышение давления (например, в результате простого открывающегося вентиля давления); б) контролируемое повышение и понижение давления. Затемненная площадь - нормальный интеграл давление-время, заштрихованная площадь - коррекция посредством дополнительного импульса давления.

Практическое определение осуществляется очень просто измерением проскока: время ввода выбирается так, чтобы зона пробы УФ-активного раствора доходила до детектора. Полученный ступенчатый сигнал анализируется таким образом, что отыскивается точка сигнала на половине высоты, и перпендикуляр на ось времени дает время проскока растворителя. Поскольку в данном случае можно работать с таким же растворителем, который вводится в систему, ошибка, связанная с вязкостью или радиусом капилляра, может быть незначительной. Расчет вводимого объема проводится теперь просто через время. Например, известно, что поток перемещается на 17.7 мм в минуту. При времени ввода 30 секунд (типично для анализа ионов в КЭ) и длине вводимой зоны пробы 8.9 мм это соответствует количеству почти 40 нл (при

внутреннем диаметре 75 мкм).

6.3.3. Электрокинетический ввод пробы

При этом способе ввода сосуд с пробой, в который погружен капилляр, соединяется с источником напряжения, и под действием короткого импульса напряжения компоненты пробы перемещаются в разделительный капилляр. Количество введенной пробы при этом способе зависит от величины приложенного напряжения (U_j), времени (t_j), в течение которого приложено напряжение, и подвижности компонентов пробы:

$$Q = \frac{(\mu_p + \mu_\infty) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot U_i \cdot t_i \cdot c}{L}$$

где c - концентрация пробы в растворе. Из этой зависимости видна проблема данного способа ввода пробы: компоненты пробы с различной подвижностью будут детектироваться по-разному. Если сравнить площади пиков проб с различными подвижностями при электрокинетическом и гидростатическом способах ввода пробы, то отчетливо видно, что ион, перемещающийся быстрее, при электрокинетическом вводе всегда даст больший пик и будет вводиться в капилляр с некоторой селективностью. Таблица 10 показывает отношение площадей для растворов пробы равной концентрации быстро перемещающегося рубидия и более медленных тестовых ионов.

Если разделить отношение площадей пиков из колонок 2 и 3, то получим "фактор различия" обоих ионов. Он показывает, во сколько раз больше концентрируется более быстрый ион при электрокинетическом вводе пробы. Колонка 4 дает дополнительно отношение подвижностей ионов. Корреляция с колонкой 3 убедительно показывает, что "фактор различия" совпадает с отношением подвижностей. Различная скорость миграции при электрокинетическом вводе проб определяет разную скорость отбора разных ионов.

Электрическое сопротивление раствора пробы (ионная сила) по сравнению с раствором электролита также влияет на воспроизводимость метода. Это явление проще всего может быть показано при непосредственном сравнении обоих способов ввода пробы и представлено на рис. 20. Если вводится раствор ионов калия и лития в чистой воде (сопротивление 18 кОм), то разница между гидростатическим и электрокинетическим вводами пробы наибольшая. Разница будет меньше при увеличении электропроводности раствора пробы. В результате повышенной электропроводности при электрокинетическом вводе будет происходить перенос зарядов и других ионов и будет вводиться меньше ионов пробы.

Таблица. 10

Сравнение отношения площадей пиков при электрокинетическом и гидростатическом способах ввода пробы.

Пара пиков	Отношение площадей при электронетическом вводе	Отношение площадей при гидростатическом вводе пробы	Фактор различия ("дискриминационное отношение")	Отношение подвижностей
Rb ⁺ / K ⁺	1.0	0.94	1.06	1.04
Rb ⁺ /TMA	2.08	1.33	1.57	1.57
Rb ⁺ / Li ⁺	1.17	0.69	1.70	1.73
Rb ⁺ /ДЭА	6.91	3.93	1.76	1.81
Rb ⁺ /apr	4.34	1.92	2.26	2.31

ТМА - триметиламин, ДЭА - диэтиламин, арг - аргинин.

Если существует электроосмотический поток, то при небольшом сопротивлении раствора пробы ионы вводятся в капилляр в основном в результате переноса раствора пробы за счет ЭОП, и электрофоретическое перемещение ионов играет только второстепенную роль.

Из рисунка также ясно видно, что этот эффект появляется только у ионов с очень высокой подвижностью. Наклон прямой для электрокинетического ввода калия больше, чем для лития. Причина заключается в большей подвижности калия. В случае гидродинамического ввода наклоном обеих прямых можно пренебречь, поскольку в данном случае вводимое количество пробы не зависит от сопротивления раствора пробы.

Несмотря на эти недостатки, с недавнего времени широко используется электрокинетический ввод пробы. С помощью так называемого "электростэкинга" удастся сконцентрировать пробу от 10 до 500 раз, так что порог обнаружения метода вследствие этого в целом может быть снижен. Рис. 21 показывает процесс "электростэкинга" на примере ввода раствора с ионами, которые мигрируют с ЭОП. Подробности оптимизации этой техники даются в разделе "Эффекты обогащения при вводе проб (стэкинг)".

Для автоматизированного электрокинетического ввода пробы было установлено относительное стандартное отклонение (ОСО) 4.1%. В общем, как и во всех методах с проблемами при вводе пробы, например, при капиллярной ГХ, за счет применения внутреннего стандарта можно существенно улучшить воспроизводимость количественного анализа.

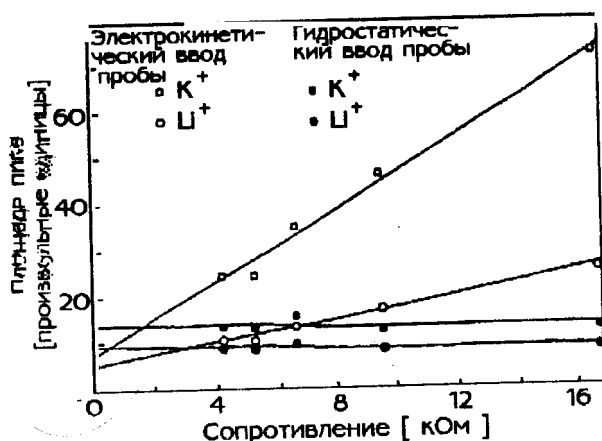


Рис. 20. Зависимость площади пика от электрического сопротивления раствора пробы при гидростатическом и электрокинетическом способах ввода пробы.

6.3.4. Делитель пробы

По аналогии с капиллярной ГХ, при КЭ также описана система деления при вводе пробы. Электрические и гидродинамические системы деления пробы различаются между собой.

У электрического делителя пробы (см. рис. 22) в середине дозирочного капилляра находится ответвление в разделительный капилляр. К обоим капиллярам (дозировочному и разделительному) приложено поле различной напряженности. Таким образом, проба движется в двух различных токовых цепях, причем отношение деления можно давать как отношение обоих токов в капиллярах. Сообщалось, что погрешность этого метода не более 3%.

При системе деления потока с помощью шприца, обычно применяемого в ВЭЖХ (ВЭЖХ-шприца), объем пробы вводится в Т-образную часть. Отношение деления дается через отношение диаметров и длин разделительного и сливного капилляров. Для этого метода ОСО, как описано в литературе, составляет около 2%, однако необходим относительно большой объем пробы. Другие системы деления, в частности, основанные на использовании ВЭЖХ-насосов, обладают худшей воспроизводимостью.

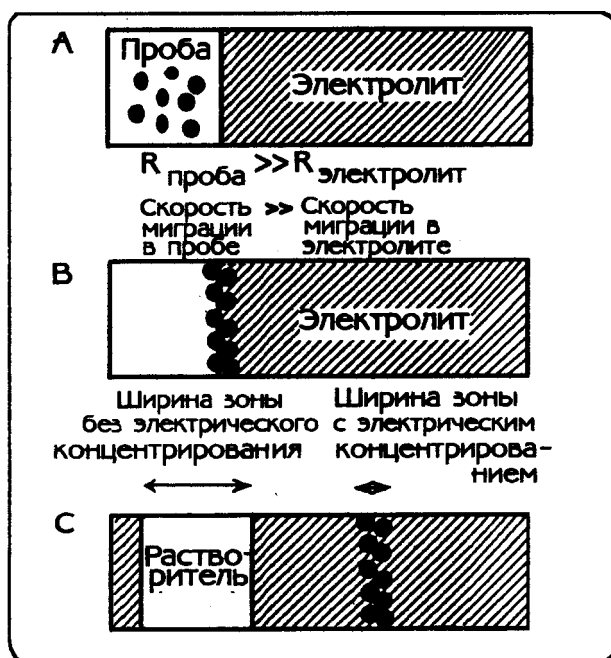


Рис. 21. Ввод раствора пробы с низкой электропроводностью. А: большой объем пробы впрыскивается гидродинамически; В: молекулы пробы перемещаются к пограничному слою между зоной ввода пробы и разделительным буфером; С: сконцентрированные молекулы пробы перемещаются в разделительный буфер.

6.3.5. Эффекты обогащения при вводе пробы (стэкинг)

Проблемы, связанные с воспроизводимостью ввода пробы при КЭ, обусловлены, кроме всего прочего, небольшой разницей в давлении и коротким временем ввода пробы. Большие вводимые объемы при нормальных условиях очень быстро уменьшают эффективность разделения за счет перегрузки по объему. Поэтому пытаются вводить большие объемы и концентрировать зоны перед разделением. Это удастся за счет использования различных эффектов перед собственно разделением с помощью КЭ. Эффекты концентрирования получаются, если работают с неомогенными буферными системами. В простейшем случае проба вводится из чистого водного раствора. Из-за различия в электропроводности между раствором пробы и буфером проба сначала ускоряется в сильном поле до границы между буфером и раствором пробы, но затем замедляется после входа в область буфера с пониженной напряженностью поля. Этот эффект уже был показан на рис. 21 и при электрокинетическом вводе пробы описан как "электростэкинг".

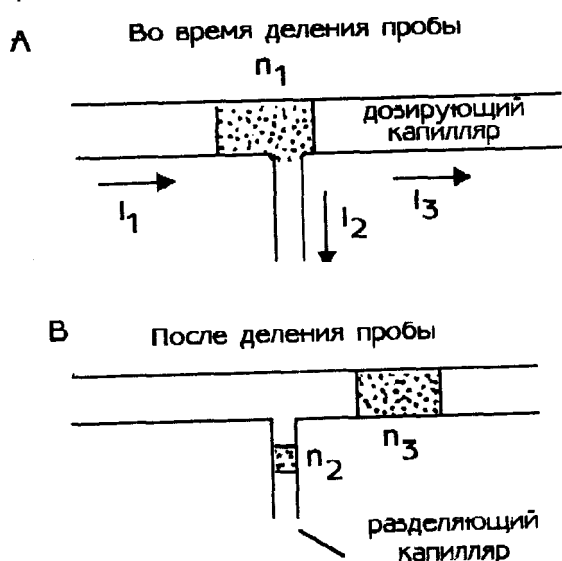


Рис. 22. Схематическое представление электрического разделения пробы. I_1 , I_2 , I_3 соответствуют потокам в различных частях капилляра; n_1 соответствует количеству пробы перед ее разделением; n_2 - введенное и n_3 - оставшееся количества пробы.

В качестве альтернативы раствору пробы с высоким сопротивлением непосредственно перед вводом пробы в капилляр вводится "водяная пробка". Падение напряжения в непроводящей электричество воде так велико, что следующая зона пробы концентрируется при имеющемся там существенно более высоком напряжении. При этом степень концентрирования доходит до 100 (см. рис.23).

При "электростэкинге", однако, концентрация молекул пробы во время процесса ввода падает на входе в капилляр до достижения равновесного состояния. Это будет представлять проблему для ионов с малой подвижностью, поскольку в этом случае допустимая длина вводимой зоны пробы будет превышена прежде, чем будет достигнуто равновесное состояние. В этом случае достигается очень незначительное концентрирование пробы. ЭОП также играет при "электростэкинге" важную роль. Если ЭОП и направление перемещения ионов ориентированы одинаково, это также будет мешать концентрированию пробы. При вводе пробы на входе в капилляр образуется зона, которая обладает очень малой электропроводностью. При увеличении подвижности ЭОП она будет формироваться быстрее и возможность "электростэкинга" сужается.

При миграции пробы против ЭОП нужно различать два случая:

если $\mu_{el} \gg \mu_{ЭОП}$, то возможно получение хороших результатов; при $\mu_{el} > \mu_{ЭОП}$ проба не может быть введена.

Резюмируя, можно сказать, что при нормальной полярности прибора КЭ (выход

заземлен) и направленном к катоду ЭОП могут концентрироваться положительно заряженные молекулы пробы, в то время как при противоположном поле при вводе пробы концентрируются анионы.

Еще эффективнее может концентрироваться проба, если поле после гидродинамического ввода прикладывается на короткое время в противоположном направлении. При условии, что ионы, которые нужно определять, перемещаются в направлении против ЭОП, капилляр может заполняться раствором пробы почти до детектора (гидродинамический ввод), и раствор пробы может удаляться из капилляра исключительно за счет инверсии полярности. Одновременно ионы, перемещающиеся против ЭОП, могут концентрироваться в пограничном слое между раствором пробы и разделительным буфером. Прежде, чем этот пограничный слой достигнет входа в капилляр, с помощью переполюсовки источника напряжения может начинаться собственно разделение. Точный момент времени для переполюсовки можно установить, следя за изменением тока, так как ток в процессе концентрирования постоянно увеличивается. Причина этого в том, что зона раствора пробы (с высоким сопротивлением) удаляется из капилляра. Когда сила тока достигает примерно 90% от максимального значения (капилляр заполнен только разделительным буфером), то источник напряжения может переполюсовываться и молекулы пробы, удерживаемые в узкой зоне вблизи входа капилляра, разделяются. На рис. 24 показаны отдельные стадии этого способа ввода, который в целом называется "стэкинг" с обращением поля. Из-за большого вводимого объема ионы пробы концентрируются примерно тысячекратно. Недостатком метода является то, что при слишком поздней переполюсовке часть ионов пробы выходит из капилляра, и что могут анализироваться только либо анионы, либо катионы.

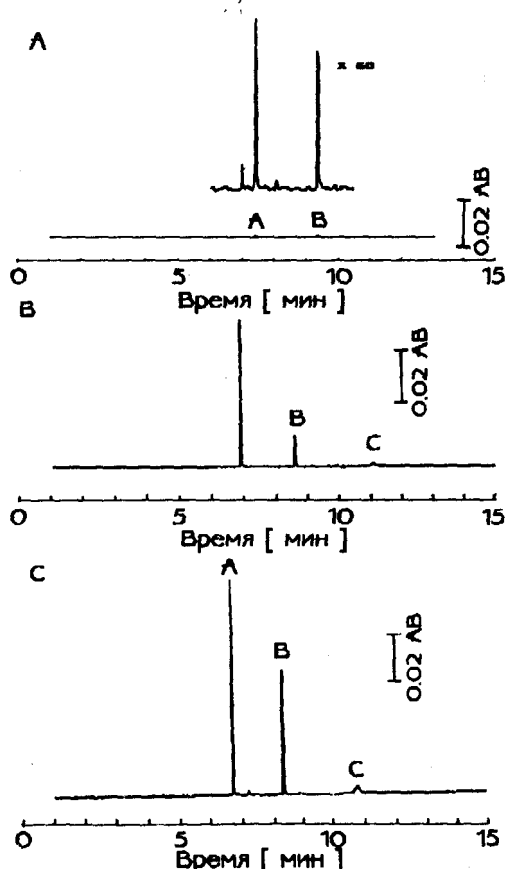


Рис. 23. Разделение РТН-аргинина и РТН-гистидина. А) электрокинетический ввод из буфера; В) электрокинетический ввод из воды; С) электрокинетический ввод из воды с "водяной пробкой" между пробой и буфером.

Другая возможность использовать негомогенность буфера для концентрирования молекул пробы состоит в выборе буфера и (или) растворов пробы с различными значениями рН. При этом подвижность ионов при прохождении скачка рН на приграничной поверхности между буфером и раствором пробы изменяется и

происходит концентрирование. Например, белки вводятся из раствора при высоком значении pH и разделяются в буфере с низким значением pH, поэтому молекулы пробы перемещаются в щелочной среде из-за их отрицательного заряда сначала в направлении анода, протонируются в приграничном слое буфера и прекращают свое перемещение (отсутствие эффективного заряда). Благодаря диффузии и миграции протонов и гидроксид-ионов ступенька pH исчезает, что приводит к разделению пробы с помощью КЗЭ. Аналогично концентрируются пробы с помощью ИЭФ. ИТФ может также использоваться как "стэкинг" в режиме реального времени. Сам принцип разделения будет описан позже. Для проведения "стэкинг"-процесса необходимо использовать ведущий и конечный электролиты, чьи подвижности несколько больше (ведущий электролит) или несколько меньше (конечный) чем подвижности ионов пробы. При этом в большинстве случаев в качестве разделительного буфера будет применяться ведущий электролит и после ввода пробы часть капилляра будет заполнена конечным электролитом. Вначале, после включения напряжения, компоненты пробы подвижность которых находится между подвижностью ведущего и конечного электролитов, за счет ИТФ концентрируются в узкие полосы через некоторое время зона конечного электролита из-за диффузии и миграции ионов расплывается и это приводит к зонно-электрофоретическому разделению ионов. При этом методе порог обнаружения снижается примерно в 500 раз. В этой форме можно проводить ИТФ-обогащение компонентов пробы с помощью коммерческой аппаратуры. Более эффективного обогащения можно достичь применяя два разделительных капилляра. Сначала ИТФ проводится в относительно толстом капилляре, снабженном на конце детектором по электропроводности. С помощью измеренного там сигнала можно точно определить, когда сконцентрированная проба может переводиться в разделительный капилляр, установленный также на конце этого капилляра. При этом достигалось примерно 10000-кратное обогащение. Другой метод совмещает хроматографическое обогащение с последующим КЗЭ. Для этого предлагаются специальные капилляры, которые со стороны «входа» имеют зону несколько миллиметров заполненную хроматографической фазой (в основном C18).

Обогащение осуществляется при прокачивании раствора пробы через капилляр, при этом гидрофильные молекулы пробы адсорбируются в режиме обращенной фазы и могут быть десорбированы после ввода пробы с помощью метанола или ацетонитрила. При этом растворитель может переноситься к стационарной фазе как с помощью давления, так и с помощью ЭОП. При этом, однако, важно, чтобы пространство между стационарной фазой и детектором заполнялось разделительным буфером. Преимуществом этого метода является его пригодность для неионной гидрофобной пробы. Эта техника, однако, из-за плохой воспроизводимости, а также из-за высокой стоимости разделительного капилляра мало распространена. Обзор методов снижения порога обнаружения при КЭ за счет концентрирования пробы в режиме реального времени дан в таблице 11.

6.4. Термостатирование

Термостатирование служит главным образом отведению джоулева тепла. Воздушные и жидкостные термостаты находят применение в коммерческих приборах, где температура может изменяться от 15 °C до 60 °C. Помимо охлаждения капилляра за счет окружающего воздуха, имеются также хорошо разработанные методы отвода джоулева тепла от капилляра. В большинстве случаев отвод тепла достигается за счет сильного воздушного охлаждения, при котором капилляр обдувается воздухом со скоростью до 20 см/с. Еще эффективней отвод тепла с помощью охлаждающей жидкости (тепловое сопротивление $2.5 \cdot 10^{-4}$ В/см*К) вместо воздуха. Она будет омывать кроме этого "вход" около детектора и "выход" около капилляра. При этом с водой можно

работать до разделительного напряжения 15 кВ, для более высокого напряжения применяют дорогостоящие фторуглеводороды. Влияние температуры на эффективность и селективность разделения в настоящее время еще обсуждается. По этой причине в случае коммерческих приборов термостатируются только капилляры (или их часть), а в сосуде для буфера не всегда поддерживается такая же температура, как в капилляре. Для разделения фрагментов ДНК в заполненных гелем капиллярах было показано, что хотя с повышением температуры производительность разделения снижается, относительная миграция, т.е. селективность разделения, может улучшиться. Дополнительно к термостатированию капилляра в некоторых приборах имеется возможность термостатировать автозагрузчик пробы. Это особенно полезно при анализе термолабильных проб. Недостатком этих конструкций является то, что помимо пробы охлаждается также разделительный буфер и поэтому существует разность между температурой разделительного буфера и выбранной температурой разделительного капилляра.

6.5. Детектирование

При детектировании в КЭ компоненты пробы проходят через часть капилляра, в которой происходит детектирование в режиме реального времени или детектируются на конце капилляра в режиме с разделением времени. При этом, в отличие от хроматографии, необходимо обратить внимание на то, что через детектор пробы движутся с различными скоростями.

6.5.1. Уф-детектирование

Большинство аппаратных требований не в последнюю очередь относятся к детектированию, так как при детектировании непосредственно в колонке УФ-поглощение происходит в слое очень малой толщины. Несмотря на это, наиболее часто применяемыми детекторами для измерения УФ-поглощения являются детекторы, применяемые в ВЭЖХ. Из-за очень малой толщины слоя (средняя величина внутреннего диаметра капилляра) к детекторам предъявляются высокие требования, касающиеся чувствительности, шумов, влияния светорассеяния и т.д. Для того, чтобы избежать потери эффективности из-за смешивания вне капилляра, детектирование осуществляют прямо в капилляре.

Типичная ширина зоны в капилляре находится в пределах 5 мм ($N = 500000$), что соответствует объему 10 нл (капилляр диаметром 50 мкм). Этот крайне малый объем является также причиной очень высокой чувствительности по массе, часто встречающейся в рекламе. Мировым рекордом является в настоящее время порог обнаружения в 300 молекул при отношении сигнал/шум три к одному для аминокислот и индуцируемой лазером флуоресценции. Для рутинного применения, однако, более важна концентрационная чувствительность. Она более чем скромна из-за короткого пути поглощения (средний диаметр капилляра).

При УФ-детектировании в КЭ концентрационная чувствительность в 30-100 раз ниже, чем в ВЭЖХ. Это зависит для поперечно облучаемых капилляров от шумов детектора и эффективной толщины слоя, которая отличается от номинальной (равной диаметру капилляра) в сторону уменьшения. Заметно мешает также частичное светорассеяние из-за несовершенной фокусировки (свет стенок капилляра) и неидеальной цилиндрической формы капилляра. Оптимизацией оптики (щель, линза и т.д.) можно в основном исключить эти эффекты. Очень трудной оптимизацию оптики УФ-детекторов для КЭ делает также полное внутреннее отражение. На рис 25 показаны рассчитанные

световые пути для различных апертур диафрагмы и капилляров. Большинство фирм-производителей применяют поэтому или фокусирующие системы линз, которые освещают область капилляра примерно в 0.5 мкм и меньше, или щели, которые имеют ширину от 50 до 200 мкм и длину от 100 до 300 мкм.

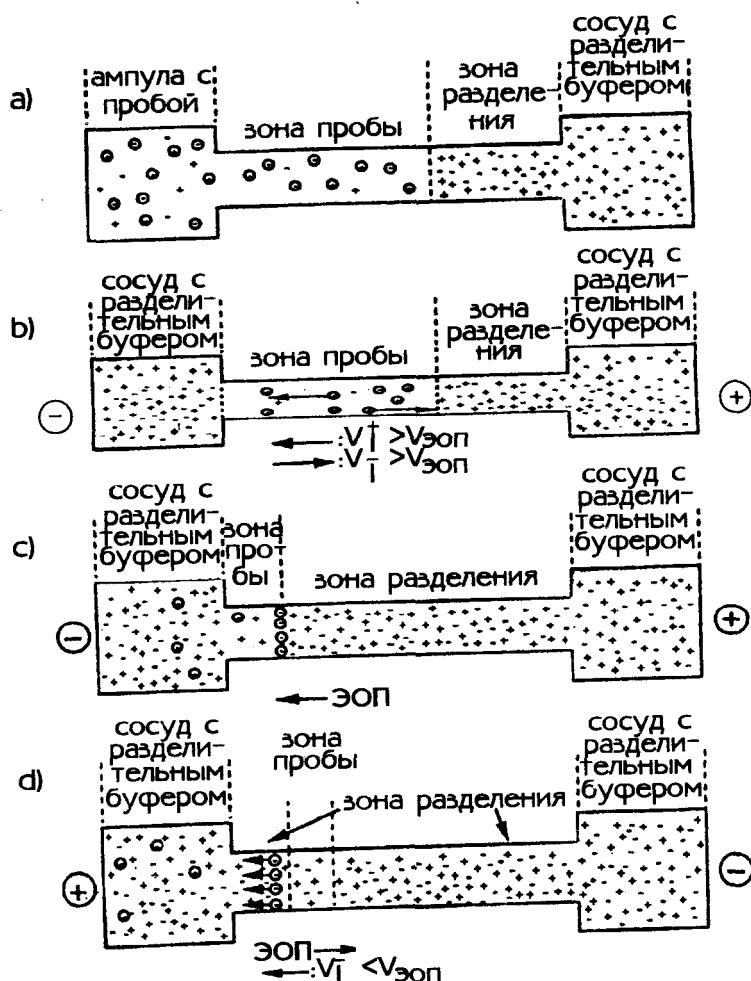


Рис. 24. Обогащение пробы с помощью изменения направления поля.

Существует много примеров улучшения чувствительности при УФ-определении в КЭ за счет увеличения толщины слоя детектирования. Чтобы увеличить толщину слоя и снизить границу обнаружения, были протестированы различные экспериментальные разработки.

Помимо применения капилляров прямоугольной формы, было также изучено применение в КЭ известных из микро-ВЭЖХ Z-ячеек.

Таблица 11.

Методы концентрирования («стэкинг»-методы) в КЭ

Метод	Снижение порога обнаружения	Применимость	Примечание
"Электростэкинг"	10-100	прямая	Быстро развивающийся метод. Результат зависит от электропроводности раствора пробы и подвижности ионов пробы.
Обращение поля	50-1000	прямая	Развитие методов для катионов и анионов различно.
ИЭФ	10-100	прямая	Хорошо применимо для слабых кислот и оснований.

ИТФ	100-1000	условная	Необходима адаптация метода для каждой новой молекулы пробы
Хроматографическое обогащение	100-500	только со специальным пилляром	Необходим дорогой и трудно устанавливаемый капилляр

Применение прямоугольных капилляров улучшает детектирование примерно в 10 раз. Практическая польза этого улучшения может не реализоваться из-за больших проблем при вводе пробы.

Применение Z-ячейки в КЭ не повышает чувствительность определения, так как помимо сигнала за счет светорассеяния также сильно увеличиваются шумы. Новейшие разработки этих систем показывают, что за счет сферической линзы на стороне источника света непосредственно перед изломом капилляра светорассеяние может быть минимизировано. Благодаря этому можно достигнуть улучшения чувствительности примерно в 11 раз для Z-ячейки с длиной светового пути 3 мм. При выбранной длине пути 3 мм отсутствия влияния или очень малое влияние на эффективность следует ожидать только для "широких" пиков. Из ВЭЖХ известно, что объем пика должен быть в 5 раз больше, чем объем ячейки детектора. Это означало бы для ячейки длиной 3 мм в КЭ, что пик должен иметь в капилляре ширину 1.5 см. Однако, поскольку в капиллярном электрофорезе происходит детектирование в режиме реального времени, и благодаря малому объему ячейки детектора и отсутствию соединительных элементов размывания зон не происходит, это правило, конечно, не вполне применимо.

Удлинение участка детектирования, как в случае описанной Z-ячейки со световым путем 3 мм, имеет определенное влияние на эффективность и, как следствие, на разделение зон пробы, особенно, если в течение короткого времени анализа достигается высокая эффективность. При эффективности анализа 500 тыс. теоретических тарелок и времени миграции 5 минут от начала колонки до ячейки детектора ширина пика составляет 1.0 мм.

Это отчетливо указывает на несоответствие между объемами детектирования и пика в Z-ячейках. Такие проблемы менее существенны в капиллярах с ячейкой детектирования, имеющей форму пузырька, так как объем пика при прохождении ячейки детектирования остается приблизительно постоянным, и длина пика в капилляре будет сокращаться. Поэтому с увеличением внутреннего диаметра длина пика автоматически сокращается. Это относится не только к прохождению зон веществ через ячейку детектора, но также и к электрофоретическому перемещению веществ, так как они перемещаются вдоль линий поля через весь объем ячейки детектирования.

Рис. 26 показывает структуру и расположение стандартных блоков детекторов с одной длиной волны, сканирующих детекторов, а также ДМД. Наиболее часто используемым является УФ-детектор с постоянной или изменяемой длиной волны. Для этого в качестве источника света должен использоваться непрерывный излучатель. Даже если энергия света из-за этого значительно снижена, возможна работа в области длин волн от 190 до 320 нм.

Еще большие длины волн вряд ли можно использовать, так как только очень немногие молекулы обладают поглощением в этой области. Рис. 27 показывает сравнение интенсивности света дейтериевой лампы и некоторых других дискретных излучателей. При этом интенсивность света дискретных излучателей выше, чем у дейтериевой лампы. Это наглядно показывает возможности оптимизации УФ-

детектирования за счет повышения количества испускаемого света. Ртутную (185 нм и 254 нм) или цинковую (214 нм) лампы удается использовать только в одноволновых детекторах. Количество света, производимого этими лампами, может быть примерно в 50 раз больше, чем в случае употребляемых обычно дейтериевых ламп, так как в данном случае не возникают потери, связанные с дифракцией на решетке.

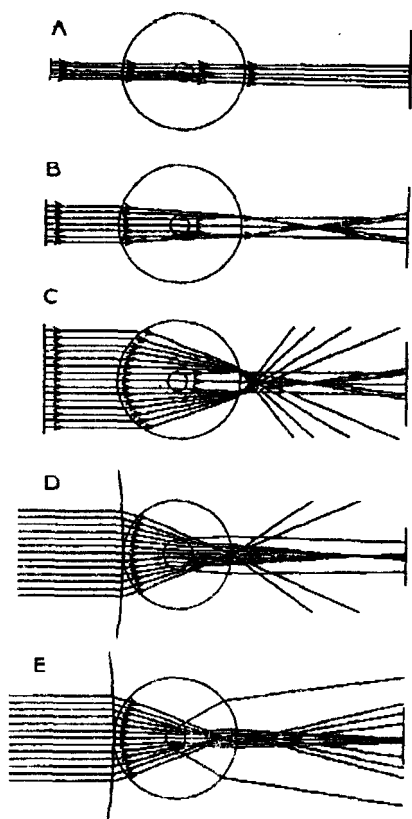


Рис. 25. А) апертурная диафрагма шириной 50 мкм, капилляр с внутренним диаметром 50 мкм и внешним диаметром 350 мкм;

В) апертурная диафрагма шириной 145 мкм, капилляр с внутренним диаметром 50 мкм и внешним диаметром 350 мкм; С) апертурная диафрагма шириной 350 мкм, капилляр с внутренним диаметром 50 мкм и внешним диаметром 350 мкм; D) с линзой, капилляр с внутренним диаметром 75 мкм и внешним диаметром 275 мкм; E) с линзой, капилляр с внутренним диаметром 50 мкм и внешним диаметром 350 мкм.

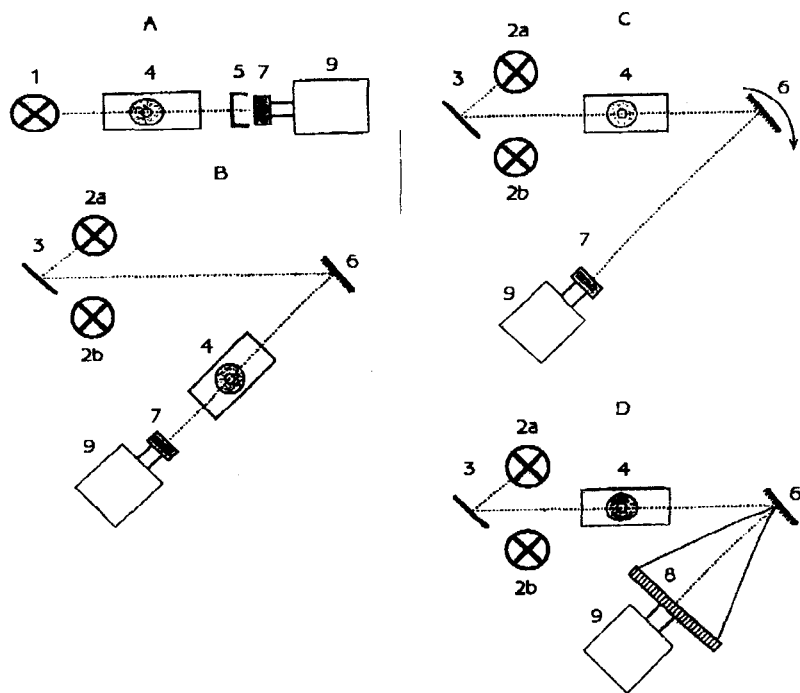


Рис. 26. Путь света различных. УФ-детекторов для КЭ. А - детектор одной длины волны с ртутной лампой (1), фильтр (5); В - многоволновой детектор с дейтериевой и вольфрамовыми лампами (2), поворачиваемое зеркало (3) и решеточный монохроматор (6); С - быстросканирующий детектор с вращающимся решеточным монохроматором; D - ДМД (8).

Несмотря на незначительную толщину слоя, запись УФ-спектров возможна с помощью чувствительных быстрых сканирующих детекторов или ДМД.

Применением многоволнового детектора в КЭ могут быть привнесены известные из ВЭЖХ преимущества. К ним относятся облегчение оптимизации буфера за счет

автоматического распознавания пика, контроль гомогенности пика за счет сравнения спектров в пределах пика, а также оптимизация чувствительности для веществ с сильно различающимися УФ-спектрами за счет интегрирования сигналов при различных длинах волн.

Вставить рис 27 стр 63

Рис. 27. Сравнение полезной интенсивности света дейтериевой, ртутной и цинковой ламп, измеренной с помощью фотоэлемента.

Из-за осложнений в процессе записи данных в случае бытросканирующего детектора измеряется только ограниченное количество точек в секунду. Поэтому шумы детектора при приеме спектральной информации при переходе от одноволнового режима к режиму быстрого сканирования увеличиваются примерно в 10 раз. Кроме того, спектральные данные из-за медленной записи при появлении пика с очень крутыми краями могут быть представлены искаженно. Диодная матрица, напротив, позволяет записывать многоволновой спектр в режиме реального времени. При этом УФ-спектры не могут искажаться за счет медленной записи данных. Так как именно при КЭ, когда из-за высокой эффективности пиков и короткого времени анализа возникают очень резкие края пиков и может реализоваться ширина пиков в несколько секунд, особенно важна быстрая запись спектров.

Пробы, не обладающие поглощением в УФ-области, можно обнаружить с хорошей чувствительностью на коммерческих УФ-детекторах с помощью непрямого УФ-детектирования. Для этого к буферу добавляют электролит, обладающий УФ-поглощением, подвижность которого близка к подвижности разделяемой пробы. Количество добавленного вместо пробы электролита (механизм вытеснения) должно быть чрезвычайно мало из-за соблюдения условия необходимой электронейтральности, так что буфер в данном случае будет обладать более высокой прозрачностью, что выражается в появлении отрицательного пика. Это схематично представлено на рис. 28. Примеры применения даются в разделе, посвященном анализу ионов. Чувствительность обнаружения при непрямом УФ-детектировании зависит от молярного коэффициента экстинкции добавляемого фонового электролита, поглощающего в УФ-области, и соответствует чувствительности обнаружения нормального УФ-поглощения.

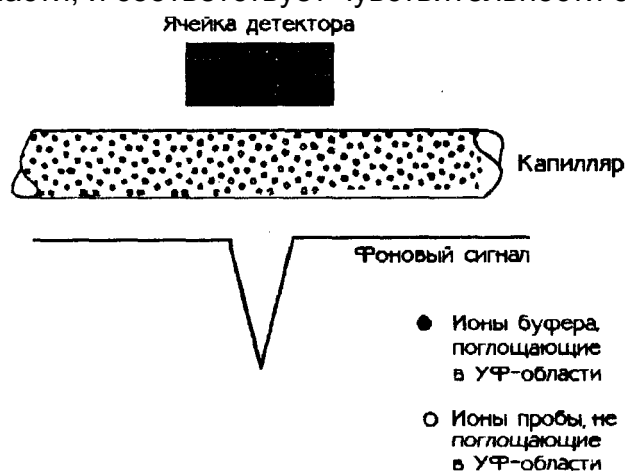


Рис. 28. Принцип непрямого УФ-детектирования.

6.5.2. Флуоресцентное детектирование

Помимо УФ-детекторов, с недавнего времени выпускаются также флуоресцентные детекторы. Отличия от детекторов ВЭЖХ заключаются в основном в длинах волн источников света. Кроме обычно используемых дейтериевой и импульсной ксеноновой ламп предлагаются также существенно более дорогие лазерные системы, причем

возбуждение в них происходит в видимой области длин волн, так что должны применяться соответствующие производные проб.

Возможно также не прямое флуоресцентное детектирование, при этом речь может идти об универсальной методике детектирования, если имеется в распоряжении подходящий флуорофор без эффекта тушения.

6.5.3. Прочие методы детектирования

Предлагаются методы электропроводности, а также другие электрохимические детекторы. Однако в настоящее время они еще коммерчески недоступны. В качестве примера здесь можно упомянуть определение следов щелочных и щелочно-земельных металлов с помощью микроэлектродов непосредственно в капилляре.

При детектировании по электропроводности возникает проблема, которая заключается в том, что помимо фоновой электропроводности электролита обнаруживается и некоторая электропроводность в зоне вещества. Техника подавления этого нежелательного явления, используемая в ВЭЖХ, здесь не применима. Успешное использование детектора по электропроводности в КЭ описано много раз. С помощью амперометрического детектирования удастся прямое обнаружение мейромедиаторов в нервных клетках, причем толщина капилляров, которые применяются для разделения, составляют 5 мкм.

Низкие скорости потока (100 нл/мин) делают возможным сочетание КЭ с масс-спектрометрией (МС). Главная проблема при таком сочетании состоит, однако, в том, что в переходнике из капилляра в источник ионов элюент не будет всасываться из капилляра за счет существующего там вакуума. При падении давления 1 бар в капилляре длиной 1 м (внутренний диаметр 50 мкм) линейная скорость потока составляет 1 см/с. Возникающий в результате этого ламинарный параболический профиль потока привел бы к заметной потере эффективности. По этой причине перед ионизацией нужно проводить "улучшение" потока в капилляре. Ионизация электрораспылением позволяет осуществлять МС-детектирование биополимеров в результате образования множества заряженных частиц. В качестве примера показано разделение четырех фосфониевых ионов. Если записать общий ионный ток, то получим только два пика. Селективное детектирование отдельных соединений возможно при определенном соотношении масса/заряд (правая часть рис. 30).

Рассматривались также другие методы детектирования (спектроскопия комбинационного рассеяния, измерение радиоактивности в режиме реального времени, круговой дихроизм, коэффициенты преломления света, капиллярная вибрация). Их возможности для рутинного использования в настоящее время еще не определены.

Само собой разумеется, что могут использоваться УФ-неактивные и нефлуоресцирующие пробы, если применять реагенты, употребляемые обычно для получения соответствующих производных перед разделением хромофоров и флуорофоров. В результате этого, однако проявляют себя недостатки предколоночного происхождения, известные из ВЭЖХ. Специальные реагенты для электрофореза, имеющие помимо хромофора еще и соответствующий заряд, являются темой для обсуждения.

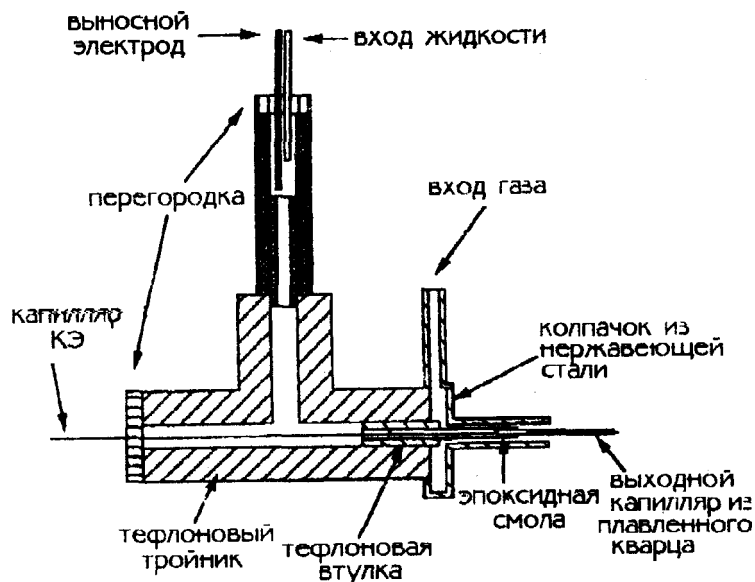


Рис. 29 Конструкция интерфейса соединения КЭ-МС.

При детектировании на основе лазерной флуоресценции для определения с помощью возбуждения на длине волны около 380 нм в большинстве случаев пробу перед разделением необходимо подвергнуть воздействию флуоресцентной метки. В качестве примера назовем разделение 3-(4-карбоксибензоил)-2-хинолин-карбоксиальдегид (КБХКА)- производных аминокислот.

Описаны первые экспериментальные разработки для получения производных после прохождения колонки, однако они пока еще не пригодны для использования вне стен исследовательских лабораторий.

В таблице 12 представлены достижимые границы обнаружения наиболее часто встречающихся систем детектирования. Из таблицы видно, что благодаря небольшому объему может достигаться высокая чувствительность по массе. Концентрационная чувствительность находится в пределах ВЭЖХ.

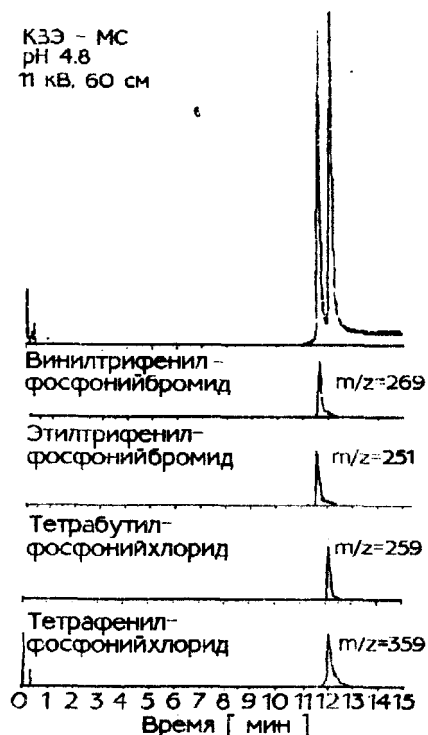


Рис. 30. МС-дегектирование при КЭ: а) универсально!,- дстсктчрона-ние при регистрации полного ионного тока; и) tV.7i.-A 7 ивное детектирование при регистрации отдельных читнчтенпи массы к заряду.

6.6. Количественный анализ

На воспроизводимость получаемых результатов влияет множество факторов: разница в электропроводности между разделительным электролитом и раствором пробы, большое различие в концентрации компонентов пробы и их электрофоретическая подвижность, различие в составе пробы. С другой стороны, преимущества КЭ проявляются тогда, когда не~обходимо проанализировать очень малые объемы проб; например, при 5 анализе ионов в дождевых каплях или в биологических пробах.

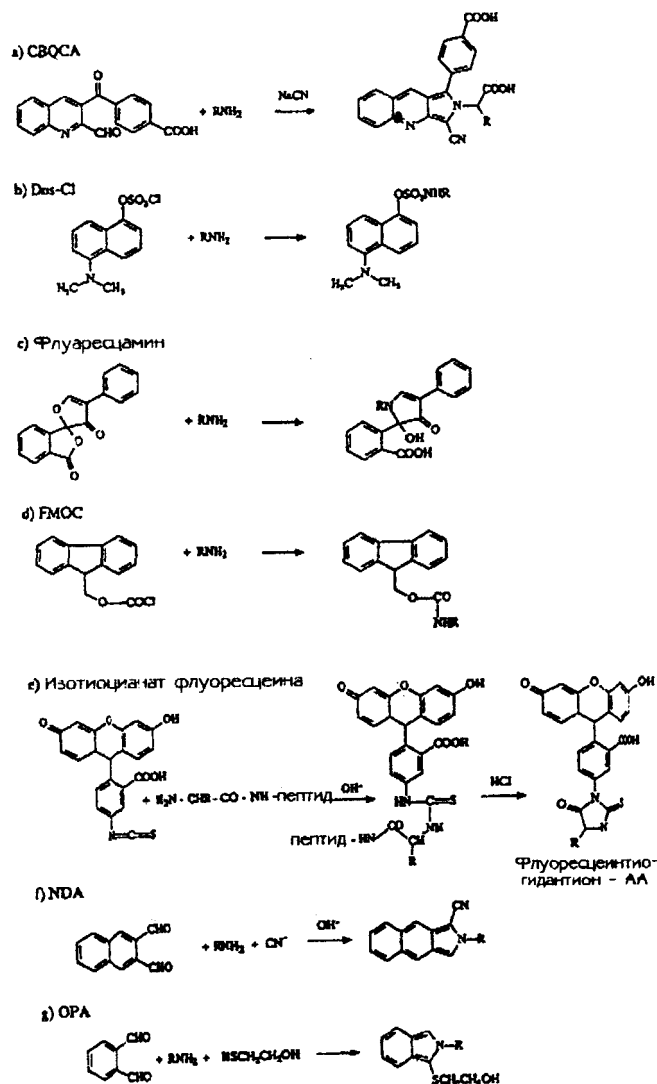


Рис. 31 Некоторые часто используемые реакции получения производных.

Таблица 12

Методы детектирования в КЭ

Принцип детектирования	Граница обнаружения. Абсолютное количество [моль]	Граница обнаружения. Концентрация [моль/л]	Типовое при-менение	Примечание

УФ-поглощение	10^{-15} - 10^{-13}	10^{-7} - 10^{-4}	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	В настоящее время стандартное детектирование в КЭ, имеется во всех коммерческих приборах
Непрямое УФ-детектирование	10^{-16} - 10^{-13}	10^{-8} - 10^{-4}	Ионы металлов, амины, органические и неорганические ионы, сахара	Имеются в коммерческих приборах
Флуоресценция	10^{-18} - 10^{-13}	10^{-9} - 10^{-4}	Производные аминокислот, ДНК, пептиды, белки	Для большинства проб необходимо получение производных
Лазерная флуоресценция	10^{-21} - 10^{-17}	10^{-13} - 10^{-7}	Фрагменты ДНК, производные аминокислот	Лазер еще очень дорог, в основном применима только в видимой и УФ-областях
Непрямая флуоресценция	10^{-16} - 10^{-14}	10^{-7} - 10^{-5}	Спирты, амины, анионы, катионы, сахара	Известно только немного приложений
Амперометрия	10^{-16} - 10^{-14}	10^{-8} - 10^{-6}	Легко окисляемые и восстанавливаемые вещества, например, нейромедиаторы	Пригоден для капилляров с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрия	10^{-18} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-5}	Ионные пробы, например, ионы металлов, амины, карбоновые	Недостаток: трудное манипулирование при замене капилляра
Потенциометрия	10^{-19}	10^{-8}	Щелочные и щелочноземельные ионы, селективное определение за счет ионоселективных микроэлектродов	Недостаток: трудное манипулирование и получение микроэлектродов
МС	10^{-17}	10^{-10} - 10^{-8}	Белки, пептиды, мониторинг лекарств	Отсутствуют проблемы совмещения, доступны коммерческие интерфейсы

Радиоактивные измерения	10^{-18} - 10^{-16}	10^{-15} - 10^{-13}	^{32}P и ^{14}C в биохимических объектах	Хорошая чувствительность определения с помощью системы остановки потока
-------------------------	-------------------------	-------------------------	--	---

Миниатюризация ввода пробы в коммерческих приборах, между тем, прогрессирует так сильно, что из общего объема пробы 3 мкл в автоматизированных приборах можно сделать множество вводов. При этом, однако, не исключено, что состав пробы во время ввода изменится. Причина заключается в занесении буфера в пробу или в селективном вводе определенных компонентов пробы при электрокинетическом вводе. Работа со столь малыми объемами затруднена, если объем пробы в автозагрузчике может изменяться за счет испарения. Эти эффекты можно уменьшить при помощи охлаждения пробы или использования герметичного затвора в сосуде для пробы. Если необработанные данные анализа представлены в форме хроматограмм или фореграмм, то количественные результаты анализа получают или определением высоты пиков, или после интегрирования в виде площади пиков. Только в области определения примесей количественное выражение их концентрации через высоту более надежно, чем через площадь пика. Этому есть две причины: первая заключается в том, что при анализе примесей высота пика пропорциональна их концентрации, так как эффекты насыщения и перегрузки можно исключить, а вторая заключается в том, что ошибка автоматизированного определения высоты в этом случае меньше, чем при интегрировании пиков. Как только высота пиков возрастает, интегрирование становится рациональным и необходимым.

Это будет показано на примере калибровочной кривой натрия при определении ионов металла с применением непрямого УФ-детектирования. В то время, как линейная область при использовании высоты пика для количественного определения очень мала, и кривая уже при 4 ppm выходит в область насыщения, при представлении зависимости площади пика от концентрации корреляционная зависимость линейна. Причиной нелинейности калибровочной кривой с высотами пиков является, кроме всего прочего, треугольная форма пиков. Как можно показать теоретически, только при гауссовой форме пиков концентрация пропорциональна как площади пика, так и его высоте. При других формах пика интегрирование обязательно для того, чтобы получить линейную калибровочную кривую.

Рис. 32 показывает полученную калибровочную кривую в области концентраций от 1 до 10 ppm.

При КЭ, в отличие от ВЭЖХ, пробы перемещаются мимо детектора не с одинаковыми скоростями. По этой причине компоненты пробы с одинаковыми молярными коэффициентами экстинкции при одинаковом вводимом количестве проявляются в виде пиков различной площади.

В простейшем случае УФ-детектора это можно легко показать, если рассчитать время, за которое движущиеся объекты с различными скоростями проходят область УФ-детектирования.

Аналогичные явления встречаются при каждом разделении в КЭ. Компоненты пробы, которые первыми движутся мимо детектора, обладают высокой скоростью, поэтому ширина их пиков на самописце меньше. Табл. 13 показывает зависимость изменения ширины пика (в см мм при записи на самописце) стандартного прямоугольного пика шириной 0.5 см. Если бы в КЭ отсутствовало уширение полос, то первые пики были бы самыми узкими, так как они перемещаются мимо детектора быстрее других.

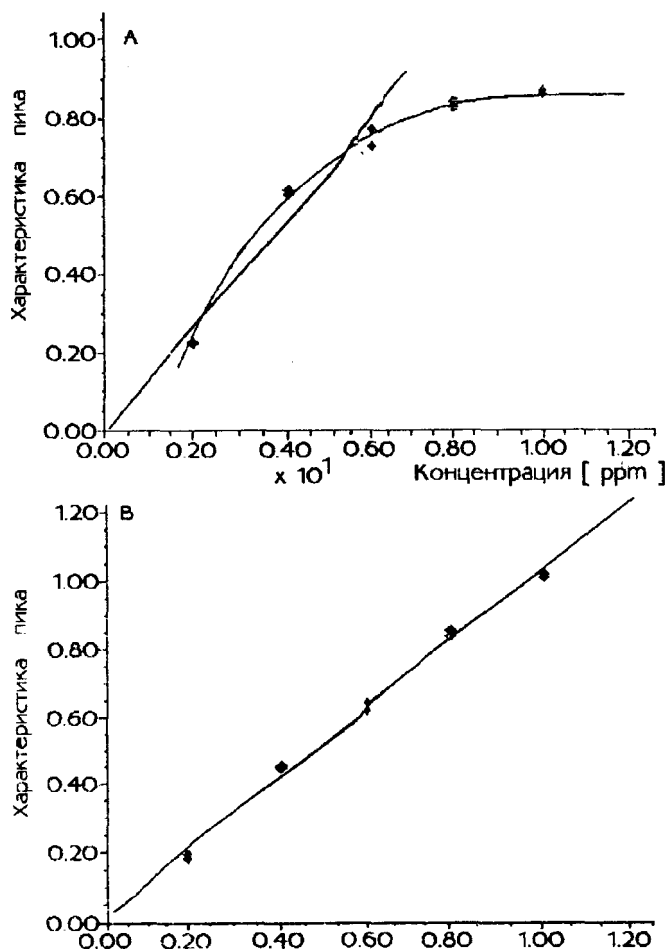


Рис. 32. Калибровочные кривые, построенные по высоте пика (А) и плотили пика (В). Условия: прибор для КЭ - Millipore Waters Quanta 4000; капилляр - 75 мкм, 50/56 см; поле - 446 В/см; буфер: 5 мМ имидазол/серная кислота, рН 5.3; ввод пробы гидростатический, 30 с, детектирование не прямое. 214 нм; проба - калий, натрий, барий, кальций, магний и литий с концентрациями 4, 6, 8 и 10 ppm.

Таблица 13

Зависимость времени прохождения пиками «окна» детектора от скорости миграции

Скорость пика [мм/с]	Время пика в "окне" [с]	Ширина пика на самописце [мм]
0.1	10	16
0.5	2.0	3.2
1.0	1.0	1.6
5.0	0.2	0.3
10	0.1	0.2

Скорость движения самописца: 60 см/мин.

Таблица 14

Зависимость площади и ширины пика от времени миграции.

Время миграции	Скорость перемещения [мм/с]	Время в детекторе [с]	Ширина пика на самописце [см]	Площадь пика сигнала с h=10см [см ²]
90	0.58	0.87	0.144	1.44
120	0.43	1.16	0.192	1.92
150	0.35	1.44	0.239	2.39

Если привести полученные площади пиков к времени миграции, то получим сигнал пробы, независящий от скорости перемещения. С помощью такого нормирования удастся в некоторых случаях сгладить колебания времени миграции.

Колебания ЭОП являются тем фактором, который через скорость миграции непосредственно влияет на площадь пика. На рис. 33 для некоторых тестовых соединений представлены времена миграции, соответствующие первым 27 вводам пробы. После первых 4 вводов (нестационарный период) достигается первое постоянное значение, при котором время миграции колеблется весьма слабо. После 9 вводов пробы капилляр был помещен на 48 часов в разделительный буфер и после этого использовался вновь. При этом уже после короткой переходной фазы появляется большой ЭОП. Это плато остается постоянным при последующих 20 вводах.

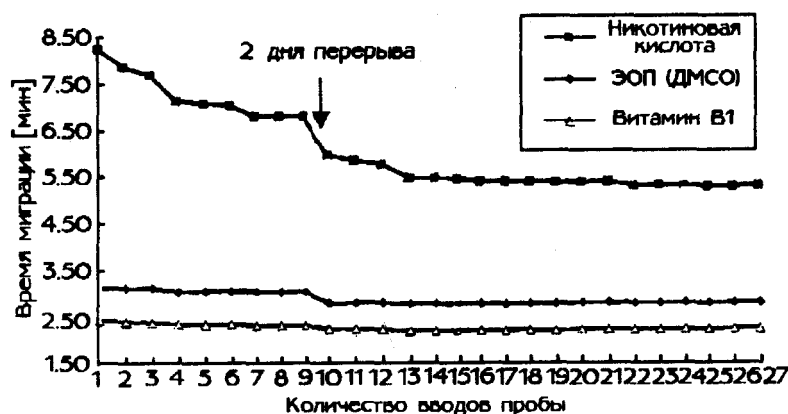


Рис.33. Воспроизводимость времени миграции.

Эти эксперименты ясно показывают, что после короткого времени установления равновесия могут быть получены воспроизводимые условия анализа. При замене буфера необходимо, однако, менять и капилляры или, по крайней мере, промывать их новым буфером от 10 до 15 минут. Так как ЭОП существенно более эффективно изменяет слой буфера на внутренней поверхности капилляра, чем приводимый в движение давлением поток, можно сильно сократить время установления равновесия, если промывать капилляр новым буфером и затем подвергать его действию электрического напряжения в течение 5-10 мин. Точное время уравнивания капилляра нельзя привести, так как эта величина сильно зависит как от буфера, так и от конкретных стадий кондиционирования.

Кроме того, на воспроизводимость результатов сильно влияет количество вводимой пробы. Рис. 34 показывает воспроизводимость системы и точность количественного анализа в зависимости от количества введенной пробы. В этом ряду измерений каждый из 12 анализов был проведен при различных концентрациях пробы, и определялись площади пиков. Для каждой новой концентрации пробы разделительный буфер в сосуде обновлялся. Статистическая обработка отчетливо показала, что при концентрации, которая превышает границу обнаружения от 20 до 50 раз, интегрирование пиков приводит к хорошим результатам. Воспроизводимость находится в пределах от 2 до 3%. Ошибка очень быстро возрастает до 7% при интегрировании вблизи границы обнаружения. В этом случае эффективность, а поэтому и возможности разделения соседних пиков улучшаются. Эффективность падает с увеличением концентрации, и при перегрузке системы (при использовании пробы с концентрацией 100 мМ) значение N составляет 140 мкм.

При оптимизации анализа необходимо находить компромисс между воспроизводимостью и эффективностью. Если требуется количественно проанализировать пробу, то для получения надежных результатов следует работать с концентрациями, превышающими границу обнаружения по крайней мере от 10 до 20 раз. Только при оптимальных условиях удастся получить хорошую эффективность и высокую воспроизводимость площадей пиков в пределах от 1.5 до 3%.

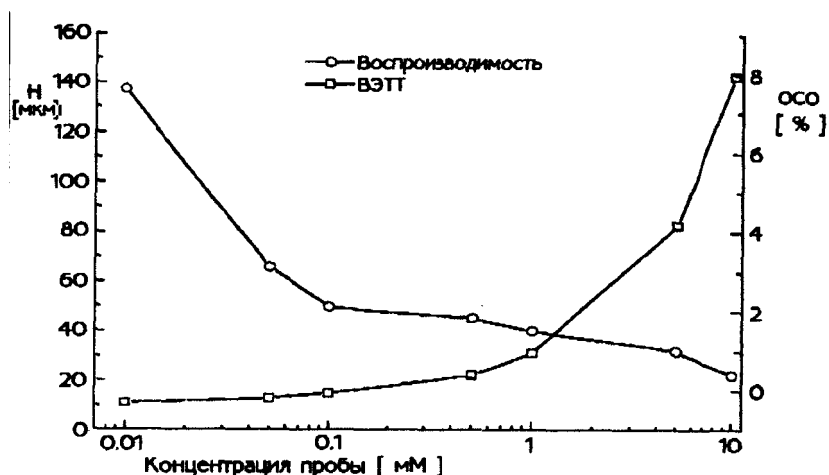


Рис.34. Воспроизводимость (площади пиков каждых 12 измерений) и уширение полос в зависимости от концентрации пробы.

Эти опытные данные хорошо совпадают с характеристиками, приводимыми фирмами-производителями и опубликованными результатами.

Воспроизводимость, таким образом, зависит от многих индивидуальных факторов. Сравнительные измерения на различных приборах КЭ в разных лабораториях показывают, что методы являются принципиально переносимыми, однако точность анализа колеблется от 1 до 2.5%. Эти испытания отчетливо показывают, что при оценке индивидуальных ошибок большее внимание следует обращать на те из них, которые вызваны аппаратурой и методом.

Таблица. 15

Сравнение воспроизводимости в различных лабораториях

Значение (n=10)	ОСО	Лаборатория						
		1	2	3	4	5	6	7
Время миграции		1.3	0.3	0.8	0.4	0.6	0.5	0.2
Высота пика		1.0	2.3	2.1	.	1.7	1.4	1.7
Площадь пика		1.2	2.6	0,6	1.3	2.2	2.5	1.7
Нормированная площадь пика		0.8	2.5	1.0	1.2	2.1	1.1	1.7
Линейность калибровочной		0.999	0.997	0.999	0.992	0.996	0.990	0.994

Измерение: Beckman P/ACE в лабораториях 1,2,3 и 6; ABI в лабораториях 5 и 7; SpectraPhysics в лаборатории 4.

Таблица 16

Факторы, влияющие на воспроизводимость площадей пиков

Фактор	Причина, эффект	Улучшение за счет:
Колебания температуры	Различие в вязкости Вводятся различные количества пробы	Термостатирования капилляра и буфера
Испарение раствора пробы	Повышенная температура в автозагрузчике Повышение концентрации пробы	Герметичного затвора у сосуда или охлаждения сосуда для пробы

Неточности при обслуживании системы	Детектор: увеличить время или понизить частоту данных Неточный ввод пробы по давлению или времени	Применения больших времен ввода пробы
Пики становятся больше/меньше	Плохая система ввода пробы	Применения капилляров с плоской поверхностью среза Удаления полиамида(2 мм) на "входе"
Плохая форма пика	Адсорбция на стенках	Покрытия или высоко-концентрированных буферов
Малое отношение сигнал/шум	Ошибка при интегрировании	Оптимизации параметров интегрирования Повышения концентрации пробы "Стэкинга" образца
Изменение времени миграции	Значение pH буфера не постоянно Проба адсорбируется на стенках Изменяется уровень буфера	Более частой смены разделительного буфера Кондиционирования капилляра с помощью NaOH
Электрокинетический ввод пробы	Площадь пика зависит от пробы	Гидродинамического ввода пробы

7. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ)

Зонный электрофорез является самым простым из описанных здесь способов разделения. Так как многие методы анализа, которые будут обсуждаться ниже, основаны на КЗЭ, необходимо детально рассмотреть его основные принципы. При зонном электрофорезе буфер, значение pH, а также напряженность поля во всем пространстве разделения остаются постоянными. Пробы разделяются за счет их различных подвижностей. Они вводятся в виде отдельной зоны на входе в капилляр и обнаруживаются в виде дискретных, отделенных друг от друга зон на конце детектора. Назначение буфера при этой технике разделения - поддерживать постоянное значение pH и обеспечивать транспортный поток. Выбор pH буфера определяет заряд ионов пробы. Концентрация буфера влияет на ЭОП. Для дальнейшей оптимизации могут использоваться добавки к буферу.

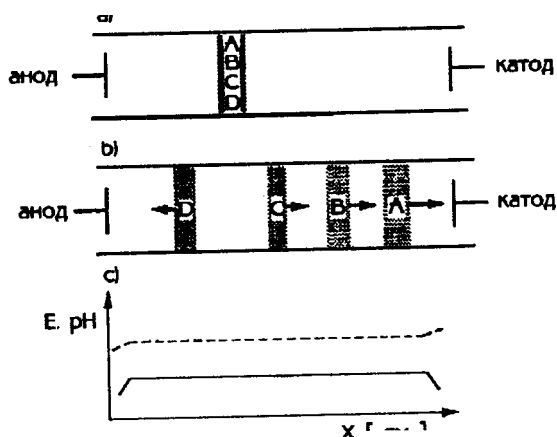


Рис. 35. Схема КЗЭ: а) начальное состояние, б) различная миграция отдельных зон образцов, в) профиль напряженности поля (сплошная линия) и рН (пунктирная линия) в сечении разделительной камеры.

7.1. Влияние рН

Влияние рН на перенос пробы к детектору объясняется двумя причинами. Как уже отмечалось, на разделение, основанное на электрофоретической миграции, в большей или меньшей степени накладывается ЭОП, на величину которого влияет диссоциация поверхностных силанольных групп. Кроме того, подвижность ионов определяется их степенью диссоциации в несущем электролите и, следовательно, его значением рН. Поэтому можно оптимизировать разделение изменением величины рН и вида буфера. Наибольшее различие в способности к перемещению для слабых электролитов, т.е. наивысшую селективность получают тогда, когда значение рН буфера лежит между значением pK_s компонентов пробы (K_s - константа диссоциации). Это поведение аналогично разделению в ионообменной хроматографии.

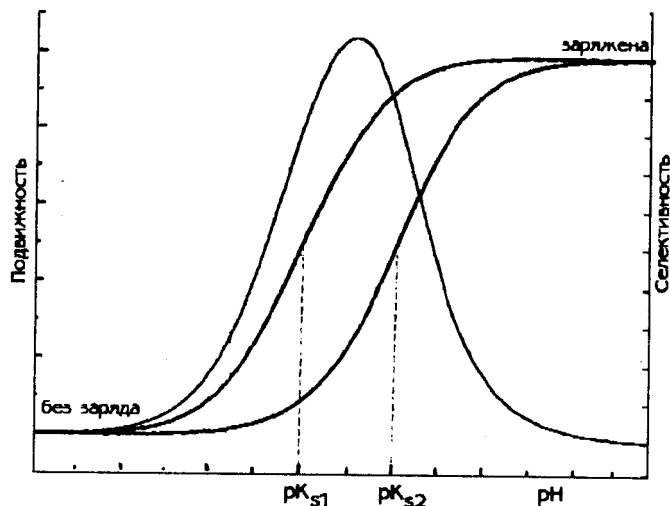


Рис. 36. Зависимость подвижности двух слабых кислот от значения рН.

Достижимое разрешение двух пиков можно рассчитать по соотношению:

$$R = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$$

где t - время миграции и w - ширина пика у его основания.

Переходя к уравнению и рассчитывая время миграции из подвижностей, получим:

$$R = 0.177(\mu_2 - \mu_1)\sqrt{V/D(\bar{\mu} - \mu_{ЭОП})}$$

Наилучшее разрешение получается, когда ионы движутся против ЭОП. Высокое напряжение также приводит к улучшению разрешения. Рис. 37 показывает рассчитанное разрешение пары пиков. Пик 2 перемещается при этом с подвижностью $0.5 \text{ см}^2/\text{кВс}$, а пик 1 - с подвижностью, составляющей от 0 до 30 % от минимальной, в поле 300 В/см в капилляре длиной 50 см ($D=10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}^{-1}$).

Недиссоциированные компоненты пробы движутся через капилляр со скоростью

ЭОП. ЭОП зависит, как было показано, также от pH и других свойств электролита, особенно от ионной силы. Возможности, которые появляются из-за наложения электрофоретического перемещения и ЭОП, можно продемонстрировать на примере разделения нуклеотидов. Если ЭОП направляется к катоду, нуклеотиды движутся к аноду, причем наиболее быстро движется трифосфат благодаря наиболее высокому заряду.

Даже при высоком значении pH (>10) ЭОП недостаточен для того, чтобы перенести трифосфат к детектору на катode. Если электрофоретическая подвижность моно- и дифосфата меньше, чем ЭОП, они переносятся к детектору, которого достигают через различное время. Разделение этой пробы показано на рис 38. При таких экспериментальных условиях векторного вклада ЭОП недостаточно для переноса трифосфата, который в данном случае перемещается в анодное пространство. При переполюсовке можно определить трифосфат, в то время как ди- и монофосфаты вместе с ЭОП движутся в другом направлении.

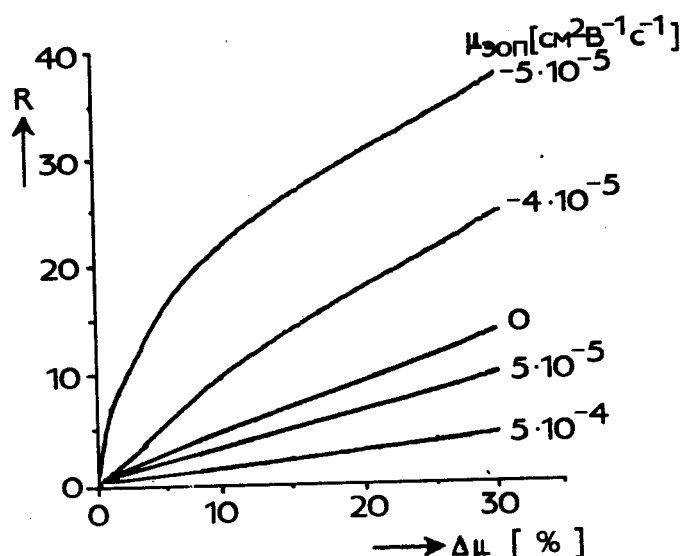


Рис. 37. Разделительная способность R двух пиков в зависимости от ЭОП и разницы подвижностей.

При добавлении веществ, образующих ионные пары, подвижность изменяется так, что при анализе могут разделяться все нуклеотиды. С помощью обращения ЭОП в результате модификации поверхности и одновременного изменения направления поля возможно разделение ионов с сильно различающимися подвижностями (см. анализ ионов).

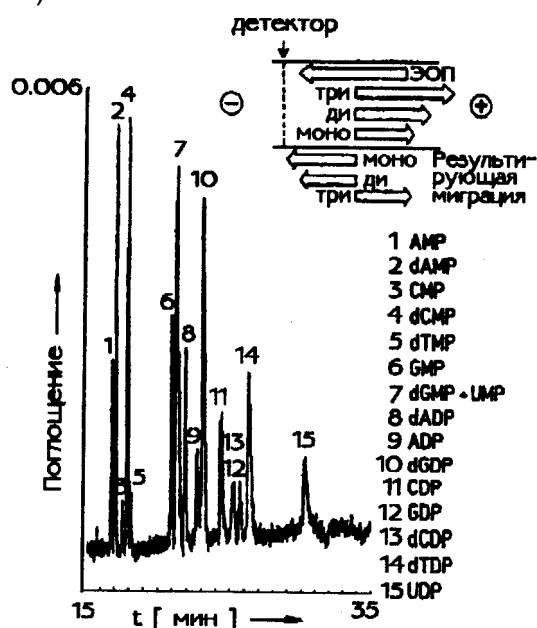


Рис. 38. Разделение некоторых нуклеотидов с помощью КЗЭ.

7.2. Влияние концентрации буфера

На рис. 6 уже было показано влияние ионной силы на ЭОП. Подвижность ионов должна зависеть от концентрации буфера. Важной является также ранее описанная зависимость интенсивности пиков от концентрации буфера. С одной стороны, концентрацию буфера нужно выбирать настолько высокой, чтобы значение pH оставалось постоянным и по возможности минимизировались бы эффекты перегрузки, но, с другой стороны, чтобы ЭОП еще допускал быстрое время анализа и не появлялось бы дополнительное уширение полос из-за тепловыделения. При этом, естественно, в капиллярах с маленьким внутренним диаметром применяется высокая концентрация буфера. Для большинства применяемых капилляров с внутренним диаметром 75 мкм применяются обычно буферы с концентрациями от 10 до 50 мМ.

7.3. Выбор буфера

При выборе буфера следует обращать внимание на множество факторов. Как было показано, для достижения хороших результатов разделения необходимо совпадение подвижностей ионов пробы и буфера. Концентрация ионов буфера должна быть больше, чем концентрация ионов в растворе пробы. Это приводит к симметричным четким зонам, так как только тогда на ионы пробы не влияет электрическое поле. С другой стороны, высокая ионная сила при заданном падении напряжения означает высокую плотность тока и поэтому увеличение джоулева тепла. Этот эффект можно просто измерить как отклонение от закона Ома. Преимущество буфера на основе органического цвиттериона (например, 3-(α -циклогексиламино)-1-пропан-сульфо-кислотный буфер) с его очень маленькой электропроводностью является решающим при использовании капилляров с большим внутренним диаметром.

Значение pH определяет заряд пробы и поэтому существенно изменяет селективность разделительной системы. Обзор влияния отдельных параметров на систему разделения приведен на рис. 39.

Поскольку время анализа обратно пропорционально приложенному напряжению, при низкой концентрации буфера всегда достигается более короткое время анализа.

Резюмируя, можно предъявить следующие требования к буферной системе в КЗЭ:

- селективность для разделяемых ионов,
- стабилизация значения pH, буферная емкость (воспроизводимость) ,
- малое УФ-поглощение при детектируемых длинах волн,
- соответствие между подвижностями ионов пробы и буфера,
- противоионы должны обладать очень малой подвижностью (отсутствие тока),
- воспроизводимое получение буфера.

7.4. Области применения

Электрофорез в гомогенной буферной системе при унифицированной напряженности поля является стандартным методом, который особенно эффективен при разделении маленьких молекул с постоянным зарядом. Поэтому можно без больших трудностей разделить алифатические и ароматические карбоновые кислоты, сульфокислоты, аминокислоты, фенолы, нуклеотиды и амины. Показательные примеры разделений, имеющих важное прикладное значение, приведены в двух обзорных статьях Кура (см. список литературы).

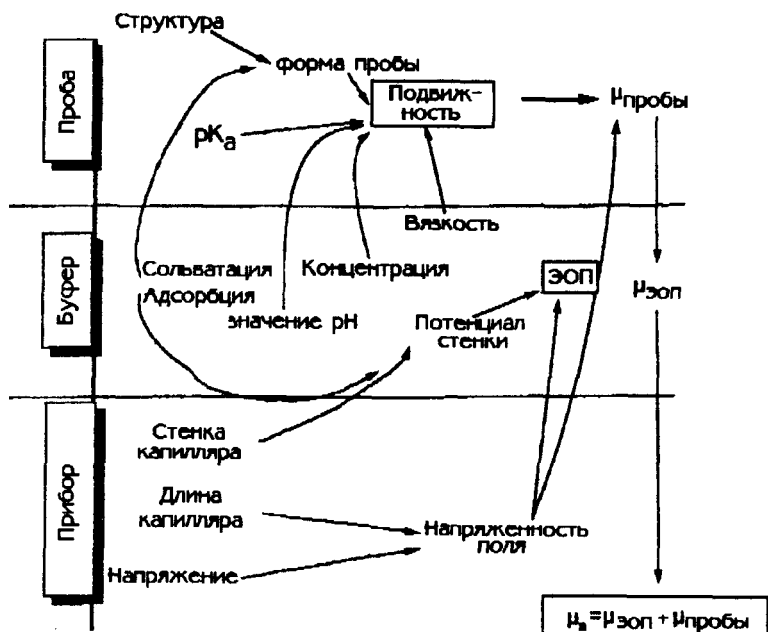


Рис. 39. Факторы, влияющие на КЗЭ.

Примером может служить разделение природной смеси танинов, представленное на рис. 40. Показаны также УФ-спектры, записанные в режиме реального времени с помощью ДМД.

Как типичное применение КЗЭ, в следующей главе будет описано разделение ионов, не имеющих собственного УФ-поглощения. С помощью КЗЭ может также осуществляться разделение белков, если подавляется обменное взаимодействие между пробой и стенками капилляра. Этому разделению также посвящена отдельная глава.

Разделение заряженных молекул с относительно большими гидрофобными остатками можно улучшить добавлением ДЦН; возможности оптимизации разделения методом КЭ с добавлением детергента подробно обсуждаются в разделе, посвященном мицеллярной электрохроматографии.

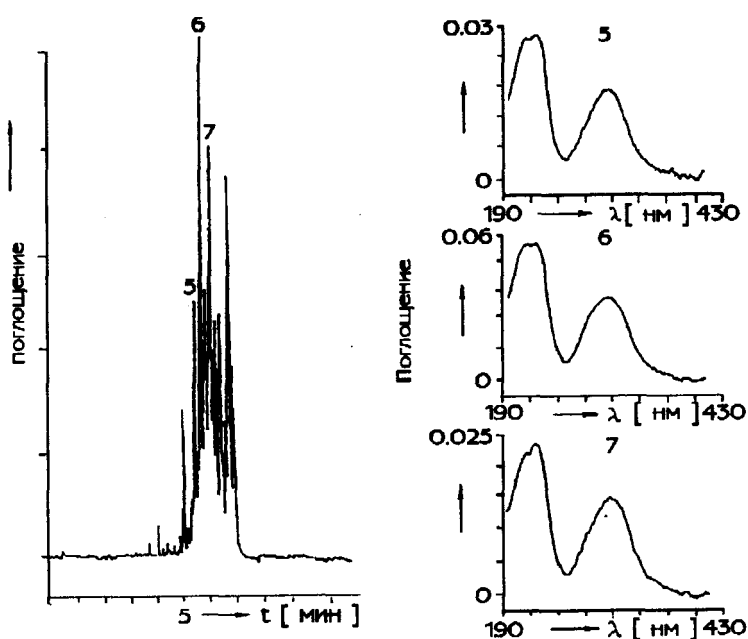


Рис. 40. Разделение смеси танинов (галловых кислот).

8. Непрямое УФ-детектирование в КЭ

Вещества, которые во всей УФ-области обладают небольшим коэффициентом экстинкции, часто необходимо вводить в высокой концентрации, для того, чтобы получить сигнал этого соединения в детекторе. Однако для такой пробы разделительная система часто бывает перегружена и интенсивность пиков так мала, что невозможно практическое применение такого разделения. Существенно чувствительнее такие вещества могут анализироваться при использовании других принципов детектирования (детектирование по электропроводности, потенциометрическое детектирование). Но поскольку до настоящего времени нет других детекторов для рутинных исследований в коммерческих приборах КЭ, косвенное УФ-детектирование в КЭ имеет особенное значение.

Этот вариант УФ-детектирования известен в хроматографии с начала 80-х годов и применялся для детектирования ионов в ионно-обменной хроматографии (ИОХ). С помощью традиционных УФ-детекторов могут также обнаруживаться непоглощающие в УФ-области вещества. Недостатки этого метода заключаются в следующем: 1 - появление так называемых "системных пиков", которые необходимо разделить от зон веществ при помощи дополнительного оптимизирования разделения; 2 - необходимость работы с высокими концентрациями буфера для вымывания проб из стационарной фазы, что в случае толстых слоев покрытия капилляра в ВЭЖХ приводит к большой величине адсорбции на стенках и, тем самым, к повышению шумов и других помех. Большого развития этот метод не получил, поскольку появление детекторов по теплопроводности в ВЭЖХ при рутинных измерениях составило ему сильную конкуренцию. Кроме того, сочетанием детектирования по теплопроводности с техникой подавления ЭОП в рутинных измерениях удастся увеличивать чувствительность детектирования в 10-100 раз.

В КЭ техника косвенного УФ-детектирования описана уже давно, еще до того, как стали известны ее большие возможности. Только позднее, в работах Джандика (Jandik) и Джонса (Jones) были выяснены преимущества применения косвенного УФ-детектирования в КЭ. Наряду с короткими временами анализов для многих анионов этот метод показал чрезвычайно низкую границу обнаружения в области концентраций от 0.1 мг/л и ниже.

8.1. Непрямое УФ-детектирование анионов

Из теории следует, что для детектирования анионов, непоглощающих в УФ-области, необходимо найти такую буферную систему, которая сама хорошо поглощает в этой области. При этом подвижность ионов буфера должна быть близка к подвижности анализируемых веществ. В качестве детектора анионов с большой и средней подвижностью подходят хромат-ионы, вводимые в раствор серной кислоты с концентрациями от 2 до 10 мМ. Для анализа быстрых и медленных анионов в одном потоке необходимо остановить или, что лучше, обратить направление потока и поменять полярность источника напряжения. В кварцевых капиллярах и приборах КЭ с нормальной полярностью (катод на выходе), как показано на рис. 41, в направлении детектора (к выходу) движутся только медленные анионы, в то время как быстрые анионы сразу после ввода пробы выходят из зоны разделения в направлении анодного сосуда с буфером.

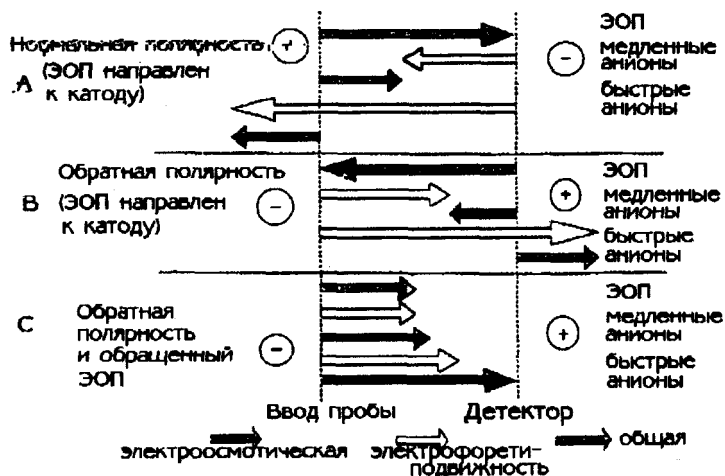


Рис. 41. Направления движения анионов при разделении методом КЭ. Заполненные стрелки - электрофоретические подвижности, незаполненные - абсолютные подвижности и ЭОП. Случай А - способ с нормальной полярностью (нормальный способ), ЭОП направлен к катоду, выход заземлен. Случай В - способ с переключенной полярностью, ЭОП направлен к катоду, вход заземлен. Случай С - с переключенной полярностью и с анодным потоком, ЭОП направлен к аноду, вход заземлен.

переключенной полярностью и с анодным потоком, ЭОП направлен к аноду, вход заземлен.

Ситуация, обозначенная как случай А на рис. 41, приводит к распределению подвижностей, при котором детектируются только медленные анионы. На рис. 42 а представлено такое распределение подвижностей для некоторых часто встречающихся анионов. При этом абсолютные подвижности недетектируемых анионов рассчитываются по подвижности ЭОП и электрофоретической подвижности анионов (см. рис. 43).

Быстрые анионы удастся детектировать только при переключении полярности источника напряжения (случай В). В этом случае они движутся "вверх по течению" против направления ЭОП. Однако медленные анионы выводятся из капилляра быстрым ЭОП. Это явление представлено на рис. 42 а, а также в виде исходных данных - на рис. 43. В этом случае разделение тестовой смеси, включая фториды, длилось примерно 9 минут, а фосфат-ионы детектировались спустя почти 20 минут в виде очень слабого пика. Применяя аппаратуру КЭ и буфер, обращающий ЭОП и направляющий его тем самым к аноду, удастся разделять быстрые и медленные анионы в одном потоке (случай С).

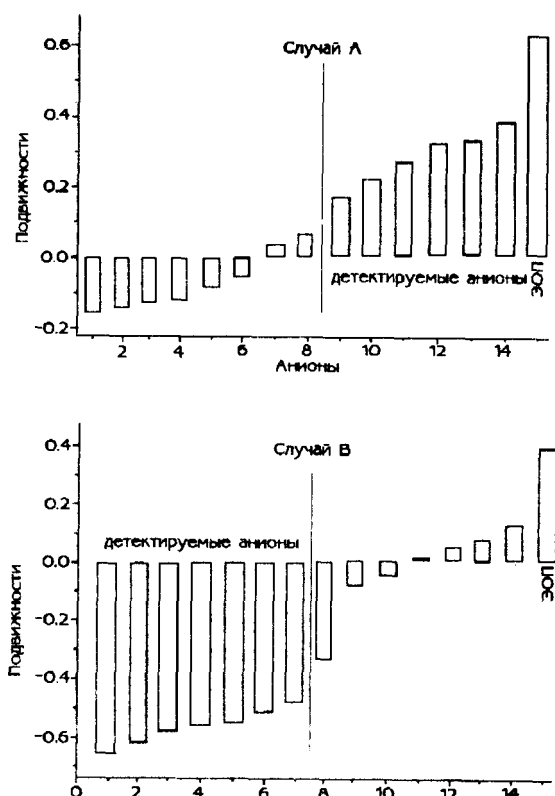


Рис. 42 а. Абсолютные подвижности при разделении анионов методом КЭ. Случай А - нормальный способ, ЭОП направлен к катоду, выход заземлен. Случай В - способ с переключенной полярностью, ЭОП направлен к катоду, вход заземлен. Условия: прибор КЭ Millipore Quanta 4000; капилляр 75 мкм, 50/56 см. Поле в случае А 600 В/см, в случае В - 600 В/см; буфер: 5 мМ хромат/серная кислота, рН 6.8; ввод пробы гидростатический 4 см, 2 с; детектирование: 214 нм. Пробы - каждая по 10 мг/л : бромид - 1, хлорид - 2, сульфат - 3, нитрит - 4, нитрат - 5, азид - 6, фторид - 7, фосфат - 8, карбонат - 9, ацетат - 10, пропионат - 11, бутират - 12, валериат - 13, Д-глюконат - 14,

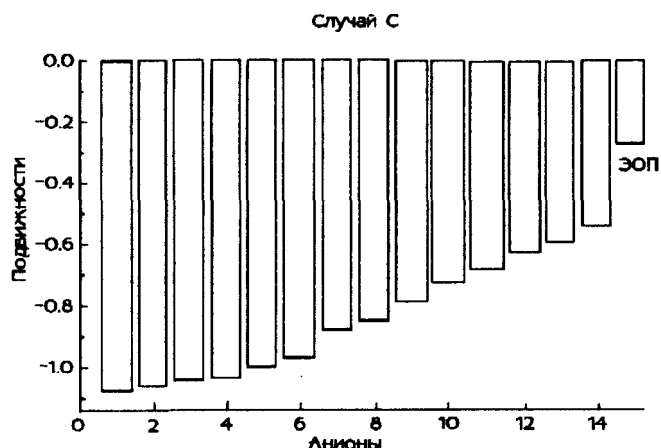


Рис. 42 б. Абсолютные подвижности при разделении анионов методом КЭ. Ситуация С - способ с переключенной полярностью, ЭОП направлен к аноду, вход заземлен. Условия: буфер - 5 мМ хромат/серная кислота, 0.5 мМ ЦТАБ, pH 6.8; остальные условия те же, что на рис. 42 а.

В ЭОП, направленном к аноду, анализ тестовых смесей вплоть до детектирования фторидов длится до 2 минут, анализ смесей, включающих глюконаты, обладающие малой подвижностью, длится менее 3 минут. Нейтральные вещества достигают детектора через 5.5 минут.

Обращение потока, необходимое для разделения, в этом случае достигается введением ЦТАБ. Этот катионный ПАВ положительно заряженными концами молекул адсорбируется на отрицательно заряженных силанольных группах стенки капилляра и при очень низких концентрациях (меньше 0.1 мМ) образует слой, компенсирующий заряд поверхностных силанольных групп.

С помощью такой обработки капилляра электроосмотический поток прекращается. При концентрациях ЦТАБ больше 0.2 мМ на стенках капилляра образуется двойной электрический слой. Вследствие гидрофобных взаимодействий на первый слой ЦТАБ накладывается второй электрический слой, молекулы которого направлены положительными зарядами внутрь капилляра.

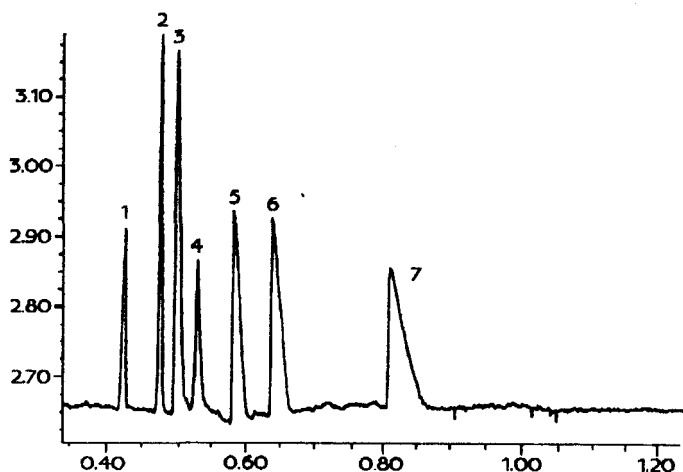


Рис.43. Разделение смеси анионов в случае В. Условия: 75 мкм, 42/50 см; поде: - 600 В/см, детектирование: не прямое, 10 см, 30 с; буфер: 5 мМ хромат/серная кислота, pH 6.8; пробы: анионный стандарт, детектируются анионы с 1 до 7 (сравн. рис.42)

В данном случае ЭОП обусловлен положительными зарядами на стенках капилляра и направлен не к катоду, а к аноду. Зависимость ЭОП от значения pH и концентрации ЦТАБ показана на рис. 45. При этом следует работать с концентрациями ЦТАБ от 0.5 до 1 мМ, т.к. при более низких концентрациях требуется большее время установления равновесного потока, а также наблюдается нерегулярность подвижности ЭОП.

Наряду с ЦТАБ можно также использовать такие соединения, как соли додецилтриметиламмония и тетрадецилтриметиламмония или гексадецилпиридинхлорид. В частности, додецилтриметиламмоний-хлорид обладает

двумя преимуществами по сравнению со ЦТАБ: 1 - концентрация его мицеллообразования выше, чем у ЦТАБ, 2 - растворимость его в воде больше, так что можно использовать концентрированные исходные растворы.

Подготовленный к использованию буфер с ЦТАБ и хроматом недостаточно стабилен, поэтому его следует ежедневно менять на свежий. Через несколько часов стояния появляется мелкокристаллический осадок, проявляемый на фореграммах как пик, который делает невозможным обработку результатов. Поэтому ежедневно необходимо применять свежий буфер, при этом работа с исходными растворами требует много времени. При использовании хромат-раствора с концентрацией хромата 50 мМ с 0.2 мМ серной кислоты и раствора ЦТАБ с такой же концентрацией, перед употреблением необходимо отмерить об. 10 % хромат-раствора в измерительную колбу, долить водой примерно до 2/3 объема колбы, добавить об. 1 % исходного раствора ЦТАБ и затем долить водой до метки измерительной колбы. Только при точном соблюдении такой последовательности при смешивании не образуется упомянутый осадок. Исходные растворы можно использовать в течение нескольких месяцев. Концентрацию 50 мМ для раствора ЦТАБ можно получить только при температурах около 25°C, а при 18°C раствор теряет прозрачность.

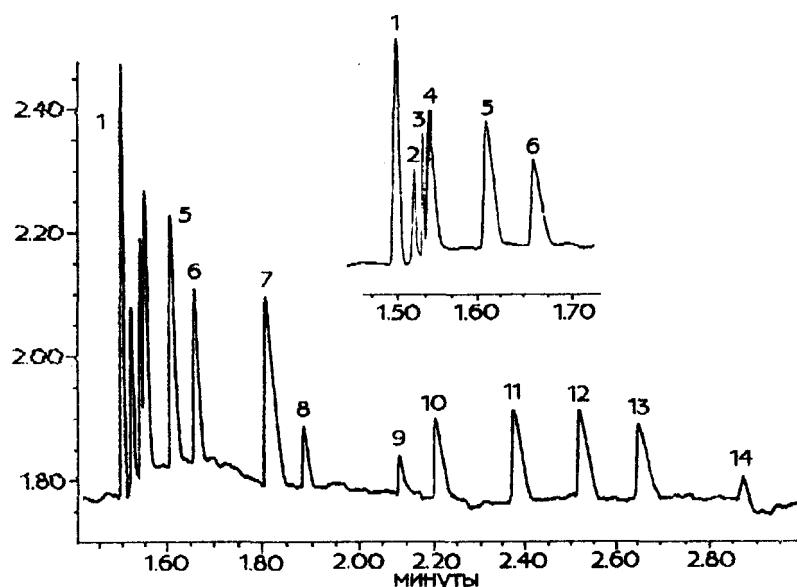


Рис. 44. Разделение тестовых смесей анионов в случае С. Условия:

прибор КЭ: Waters Quanta 4000. Капилляр 75 мкм, 50/58 см; запись данных: 20 Гц. Поле: -517 В/см, не прямое детектирование 254 нм, ввод пробы гидростатический, 10 см, 30 с; буфер: 5 мМ хромат/серная кислота, pH 8.0 с 0.5 мМ ЦТАБ; проба: анионный стандарт с Юртт, см. рис. 42.

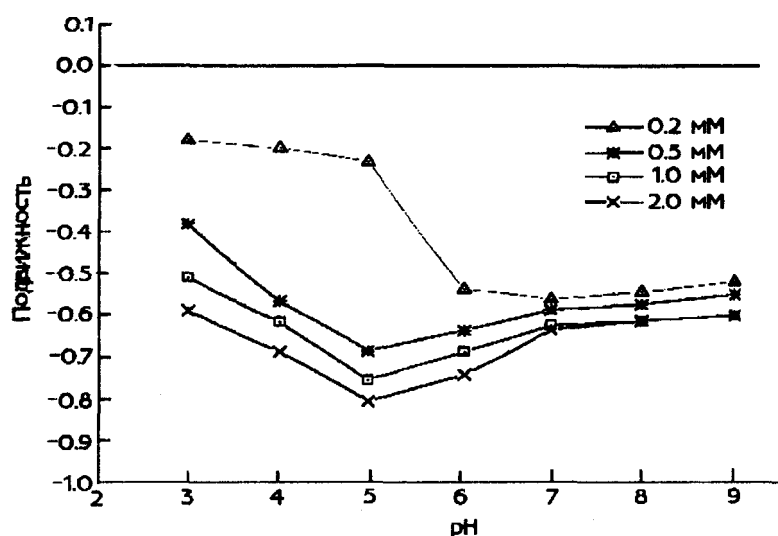


Рис. 45. Зависимость электроосмотических потоков от значения pH при различных концентрациях ЦТАБ. Условия: прибор КЭ - Beck-man, P/ACE 2000; капилляр 75 мкм, 40/47 см. Поле: -532 В/см, детектирование: 214 нм, ввод пробы давлением 3 с, буфер - 10 мМ фосфат; нейтральный маркер: бензиловый спирт.

Из-за очень высокой эффективности (300 - 500 тыс. тарелок на метр) и коротких времен анализа не исключены проблемы записи данных. Для ширины пиков меньше

нескольких секунд достигается граница возможности записи данных для большинства приборов КЭ. Например, достичь необходимых для хорошего интегрирования 20 точек для каждого пика с частотой записи данных 20 Гц в этих условиях уже не удастся.

Если вместо обращения потока проводить только его остановку, разделение анионов можно провести за 10-15 минут. Эта возможность часто рекламируется, однако для разделения анионов эта методика никаких преимуществ не дает.

Вещества, останавливающие, но не обращающие поток, представлены в таблице 17 вместе с уже упоминаемыми буферными добавками. Эти вещества, хотя и нейтрализуют отрицательный поверхностный заряд капилляра, однако двойной электрический слой не образуют и, тем самым, обеспечить избыточный положительный заряд на поверхности капилляра не могут.

Таблица 17.

Возможности влияния на ЭОП.

Буферные добавки	Используемые концентрации, мМ	Влияние	Проблемы
ЦТАБ	0.2-1.0	Обращение ЭОП	Мицеллообразование, растворимость до 50 мМ
ДДТАБ	0.2-2.0	Обращение ЭОП	Мицеллообразование
ГДПХ	0.2-1.5	Обращение ЭОП	Мицеллообразование, поглощение в УФ-области
SB 14	1 -10	Очень малый ЭОП	Образование ионных пар
Спермин	2-10	Очень малый ЭОП	
Диэтилентриамин	1 -5	Очень малый ЭОП	
Полиэтилен-амин	0.5-2.0	Обращение ЭОП	
Покрытие SAX	-	Обращение ЭОП	Низкая стабильность

ЦТАБ - цетилтриметиламмонийбромид

ДДТАБ - додецилтриметиламмонийбромид

ГДПХ - гексадецилпиридинхлорид

SB 14 - тетрадодецилдиметиламмонийпропансульфоокислота.

SAX - сильный анионообменник

Наряду с регулированием ЭОП в разделении анионов большую роль играет также подвижность анионов буфера. Ниже приведены характеристики ряда анионов, поглощающих в УФ-области (таблица 18).

Таблица 18.

Буферные вещества для непрямого УФ-детектирования анионов.

Буферный ион	Подвижность (см ² /кВ.с)	Область pH	УФ-область (нм)	Проблемы
Хромат	-0.8	6- 10	<220 и 250 -280	Токсичен
Молибдат	-0.7		<290	Изополикислоты, начиная от pH 6

Сорбиновая кислота	0.24	>3	225 - 275	
N-ацетил-триптофан	0.23	>4.5	<265	
Триптофан	0.23	>8.5	<265	
3-индолацетат	0.20	>5	214-275	
Динитробензойная кислота	0.22	>2	<260	
Тринитробензо-сульфоновая кислота	0.20	>2	220 -275	Получается только как раствор
Дили кол и новая кислота	0.23	>5	<220 и 245-265	Комплексообразование с кальцием
Нафтол-1-сульфоновая кислота	0.16	>2	200 - 225	Низкая растворимость в воде
Галловая кислота	0.26	>3	<230	Нестабильна (окисляется)

(Подвижности определены при pH 9.0 в фосфатном буфере с концентрацией 10 мМ.)

Хроматные буферные системы применяли, в частности, при определении анионов в воде озера Байкал. Разделение их представлено на рис. 46. При этом ионы с большей подвижностью - хлориды, сульфаты и карбонаты - определяются количественно методом стандартной добавки, в то время как содержание нитратов и фосфатов вследствие низких концентраций определяются путем сравнения с внешним стандартом.

Результаты сравнения для сульфат-ионов показаны на рис. 47. Данные аналогичных измерений с помощью ИОХ хорошо коррелируют с результатами, полученными методом КЭ.

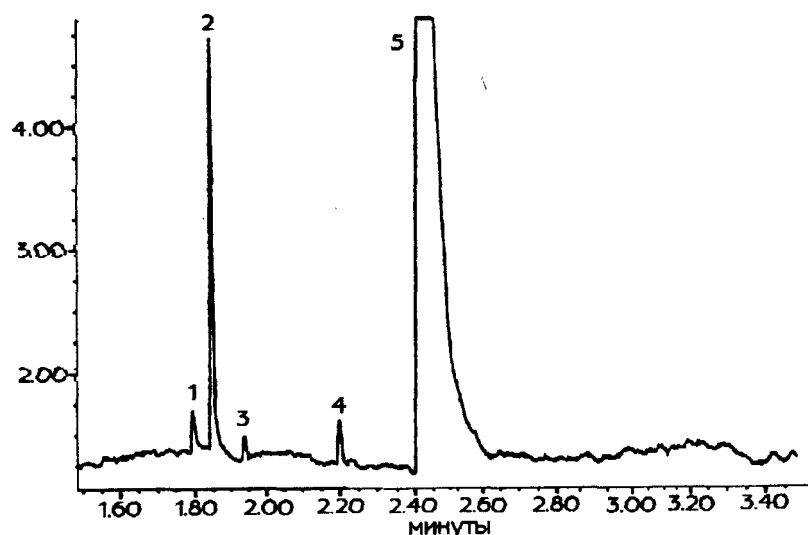


Рис. 46. Определение анионов в воде, взятой с поверхности озера Байкал. Условия: прибор КЭ - Waters Quanta 4000. Запись данных: 20 Гц, капилляр 75 мкм, 50/58 см; попе: - 431 В/см, не прямое детектирование 254 нм, ввод пробы гидростатический, 10 см, 30 с; буфер: 5 мМ хромат/серная кислота, pH 8.0, 0.5мМ ЦТАБ; порядок выхода пиков: хлорид - 1 (0.5 ppm), сульфат - 2 (12.4 ppm), нитрат - 3 (<0.5 ppm), фосфат - 4 (<0.5ppm), гидрогексакарбонат - 5 (81.1 ppm).

Преимущества КЭ по сравнению с ИОХ заключаются в крайне коротких временах анализа и в возможности определять в одном потоке наряду с другими важными анионами также и карбонаты.

8.2. Непрямое Уф-детектирование катионов

Методом непрямого УФ-детектирования можно обнаружить также и катионы. Впервые разделение катионов этим методом описано Ф.Форетгом в 1990 году. В его статье было показано, что метод КЭ при разделении лантанидов по эффективности,

времени анализа и разрешению пиков превосходит ИОХ. С помощью КЭ удастся разделить все лантаниды, что невозможно сделать даже при оптимизации ионно-хроматографических систем.

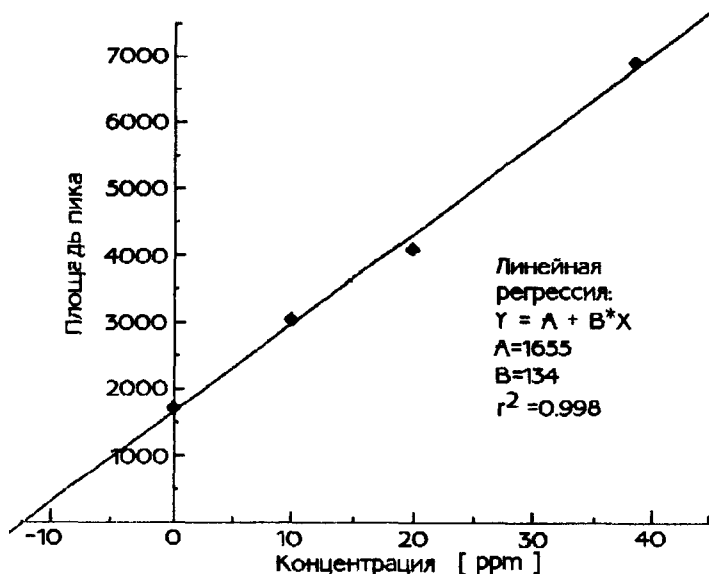


Рис. 47. Сравнение по методу стандартной добавки для определения анионов в воде озера Байкал. Условия те же, что и описанные на рис. 46; к 4000 мкл пробы были добавлены с помощью пипетки два раза по 40 мкл стандартного растворами один раз - 80 мкл стандарта с 1000 ppm сульфата. Подученные пики отложены в зависимости от концентрации.

Теоретические выкладки показывают, что ЭОП и движение катионов в капиллярах из плавленного кварца имеют одинаковое направление, поэтому аппаратура КЭ для разделения катионов должна быть такой полярности, чтобы выход был заземлен.

Таким образом, перенос ионов в ЭОП при КЭ налагается на движение катионов. Это дает возможность осуществить их быстрое разделение. В качестве буферной системы в этом случае хорошо подходит имидазол с концентрацией 5 мМ и значением pH ниже 6.0. Как показано на рис. 48, разделение заканчивается меньше, чем за 4 минуты. Примерно через 5.5 минут на электрофореграммах появляется большой пик, вызванный ЭОП. Он объясняется введенной водой, которая обладает меньшим УФ-поглощением, чем буферная система, и тем самым вызывает каждый раз отрицательный пик, с помощью которого можно определить ЭОП.

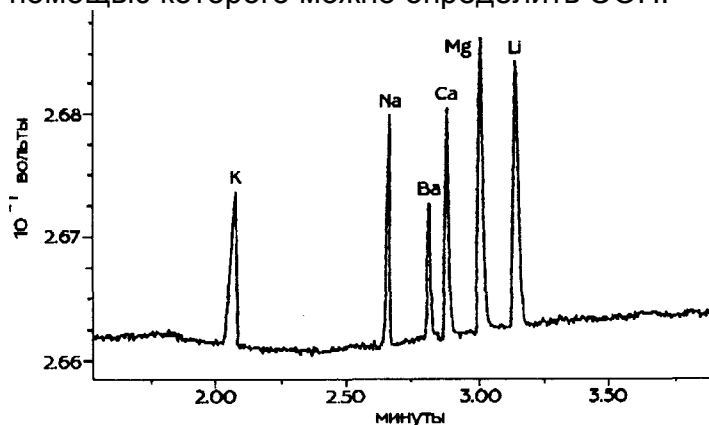


Рис. 48. Разделение щелочных и щелочно-земельных ионов в буферной системе имидазола. Условия: прибор КЭ - Waters Quanta 4000; капилляр 75 мкм, 50/56 см. Поле: 446 В/см, буфер - 5 мМ имидазол/серная кислота, pH 4.0; ввод пробы гидростатический, 30 с, не прямое детектирование 214 нм; проба - катионный стандарт с 1 мг/л каждого: калия, натрия, магния, бария, кальция и 0.5 мг/л лития.

Из формы пиков ясно видно, что подвижность имидазола близка к подвижности кальция.

На форму пика оказывает большое влияние концентрация буфера: с ростом концентрации пики становятся более симметричными. Например, интенсивность пика калия при повышении концентрации буфера от 0.5 до 12 мМ возрастает в 4 раза. Однако такой способ оптимизации имеет определенные четкие границы, т.к. при концентрации буфера больше 8 мМ резко возрастают шумовые помехи сигналов. Этот рост связан с градиентами плотности, возникающими из-за разности температур вследствие выделения джоулева тепла в электрическом поле. В капилляре с внутренним диаметром 100 мкм, применяемом в этих опытах, можно использовать имидазольный буфер с концентрациями вплоть до 5 мМ. В обычно используемых капиллярах с внутренним диаметром 75 мкм можно работать с концентрациями до 10 мМ при величинах pH от 4 до 6. В капиллярах с внутренним диаметром 50 мкм можно

достичь концентрации буфера до 50 мМ.

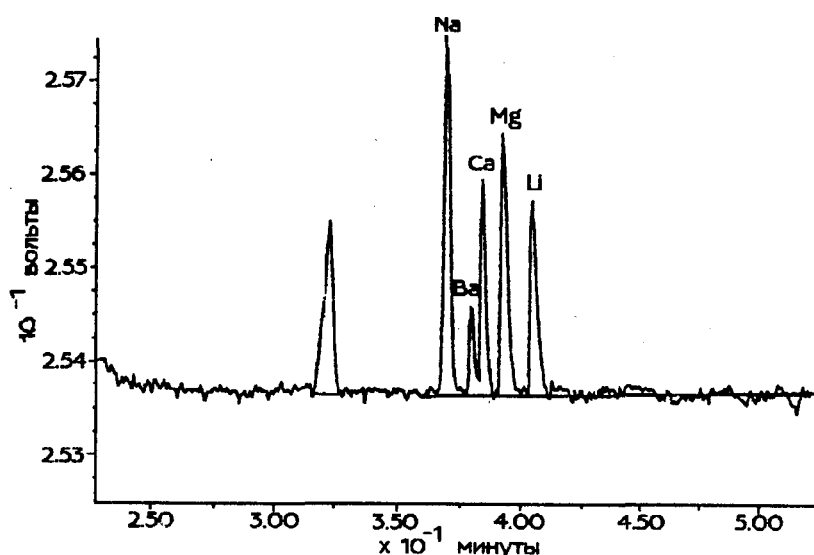


Рис. 49. Разделение тестовых ионов, оптимизированное во времени, в имидазодьной буферной системе. Условия: прибор КЭ - Millipore Waters Quanta 4000, капилляр 75 мкм, 20/26 см. Поле: 1300 В/см; буфер: 2 мМ имидазол/серная кислота, pH 6.0; ввод пробы гидростатический 10с, не прямое детектирование 214 нм. Проба - катионный стандарт с 1 мг/л каждого:

калия, натрия, бария, кальция, магния и 0.5 мг/л лития.

Используя низкоконтентрированный буфер (2 мМ) и значение pH 6.0, при большом напряжении электрического поля можно вызвать большой ЭОП и легко сократить время анализа.

На коротком участке разделения анализы проводятся очень быстро. Как показано на рис. 49, в поле 1300 В/см (30 кВт) тестовые ионы разделяются менее, чем за 30 с, при этом проявление пиков, несмотря на высокую напряженность поля, очень хорошее. При таком разделении можно, к примеру, для пика кальция достичь 600 тыс. тарелок на метр или, нормируя на время, - 320 тыс. тарелок в минуту. Сильным полем ионы ускоряются до скорости движения 0.96 см/с без существенного изменения профиля потока и проявления пиков.

Среди факторов, влияющих на детектирование, решающую роль играет прежде всего селективность разделяющих систем.

Используя взаимодействие ионов с комплексообразователем, можно влиять на подвижность. В то время как добавка оксалат-ионов к буферу не оказывает никакого влияния, цитрат-ионы резко понижают подвижность ионов щелочно-земельных металлов. Например, 100 мкМ цитрата достаточно для элюирования кальция и магния после лития.

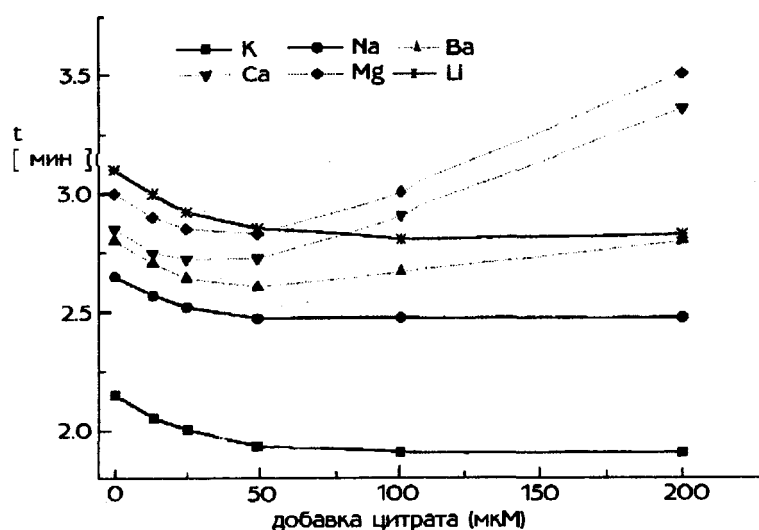


Рис. 50. Влияние цитрата на разделение щелочных и щелочно-земельных ионов. Условия: прибор КЭ - Millipore Waters Quanta 4000; капилляр: 75 мкм, 50/57 см; поле: 438 В/см. Буфер - 5 мМ имидазол/серная кислота, pH 4.6, динатрийцитрат в качестве добавки; ввод пробы давлением 5 с, не прямое детектирование 214 нм; проба - катионный стандарт с 1 мМ каждого: калия, натрия, бария, кальция, магния и лития.

Еще меньшие концентрации буферных добавок достаточны при использовании Titriplex 3 (динатриевой соли ЭДТА). Менее 20 мкМ этой соли ЭДТА в буфере достаточны для того, чтобы комплексообразование со щелочно-земельными ионами происходило настолько сильно, что их невозможно детектировать. При этом подвижности однозарядных ионов даже при концентрациях ЭДТА 200 мМ практически не изменяются. ЭДТА оказался наиболее эффективным реагентом для маскировки

щелочно-земельных ионов.

Как можно показать с помощью теоретических выкладок, использование ионов буфера с большими молярными коэффициентами экстинкции приводит к более чувствительному детектированию. Молярный коэффициент экстинкции в УФ-спектре имидазола в максимуме при 205 нм составляет 5000. Имидазольный буфер можно использовать в области от 190 до 220 нм для непрямого детектирования, т.е. область применения ограничена нижней УФ-областью. Вследствие того, что многие вещества также поглощают в УФ-области, при детектировании могут возникать помехи. Расширение области непрямого детектирования в сторону более высоких длин волн и/или в область более щелочных значений pH достигается 4-аминопиридином (4-АП). В максимуме поглощения при 205 нм 4-АП обладает молярным коэффициентом экстинкции 15500, при 245 нм - около 15600. При 254 нм существует еще один пик с экстинкцией около 14000. Это примерно в три раза больше, чем молярный коэффициент экстинкции имидазола при 214 нм. Подвижность 4-АП примерно такая же, что и у имидазола. Преимущество 4-АП проявляется в том, что им применим в более широкой области длин волн - даже при 270 нм можно проводить не прямое детектирование. Кроме того, буфер 4-АП можно использовать до значений pH 10.1 без уменьшения чувствительности буферной системы вследствие исчезновения заряда 4-АП.

В таблице 19 приведены другие буферные системы, применяемые для разделения катионов с непрямым детектированием. По подвижностям ионов пробы можно выбрать подходящий разделяющий буфер. Значения pKs берутся из литературы или определяются титрованием. Соответствующие УФ-спектры важнейших буферных компонентов представлены на рис. 51.

Воспроизводимость разделения в ионной анализе при применении буферных систем очень хорошая. ОСО времен миграции лежат ниже 0.5%, воспроизводимость площади пика - важная величина для количественных анализов - лучше 2.3%. Наряду с точностью для количественных расчетов важной величиной является их достоверность, которая подтверждается данными других методов. В качестве альтернативных методов измерения выступают атомно-абсорбционный анализ, ИОХ, а также ионный анализ с ионно-селективными электродами. Как показывают некоторые примеры, результаты, полученные различными методами анализа, в пределах известных допустимых отклонений совпадают. Определение щелочных и щелочно-земельных катионов в байкальской воде показано на рис. 52.

Для подтверждения полученных результатов эти же пробы воды изучали методами ИОХ, а также атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС).

При этом в методе ИОХ анализ пробы проводили по циклической схеме с применением синтетического ионита с детектором по электропроводности, а анализы методом ААС - по стандартному методу Шинкеля. Между найденными концентрациями ионов наблюдалось хорошее согласие.

Таблица 19.

Важнейшие параметры катионных буферных веществ.

Вещество	Формула	Подвижность (см ² /кВ-с)	Значение pKs	Спектральная область использо- вания (нм)
Гистамин		0.53	6.5; 10.5	<220 нм
4-амино-пиридин		0.48	8.9	<220 нм и 240-270 нм
Имидазол		0.46	6.9	<220 нм
9-амино-акридин		0.42	9.2	250-265 нм
Креатинин		0.37	5.3	240-270 нм
2-амино-4,6- диметилпиридин		0.32	8.1	265-280 нм
Эфедрин		0.31	9.9	<220

4-амино-М,М-диэтиланилин	0.27	8.1	<215 нм
2-амино-бензимидазол	0.20	7.5	270-310 нм
1-амино-нафталин	0.17	3.9	<230 нм, =300нм

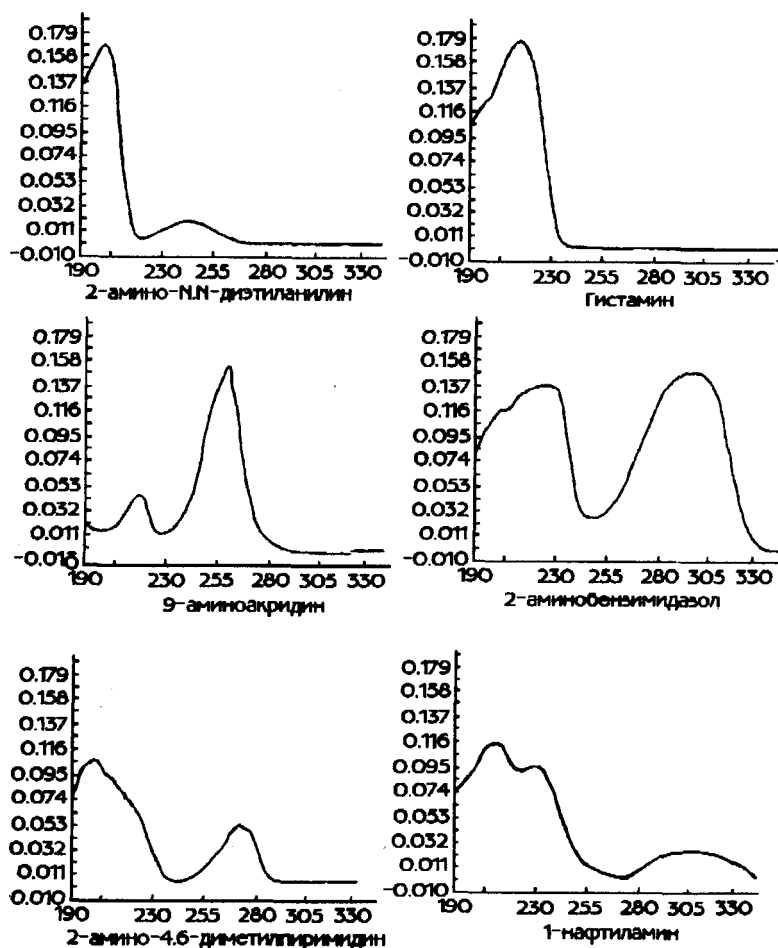


Рис. 51. УФ-спектры буферных веществ, которые можно применять для непрямого детектирования катионов. УФ-спектры веществ, протонированная уксусной кислотой, получены на детекторе Perkin Elmer LC 480 Diode Array.

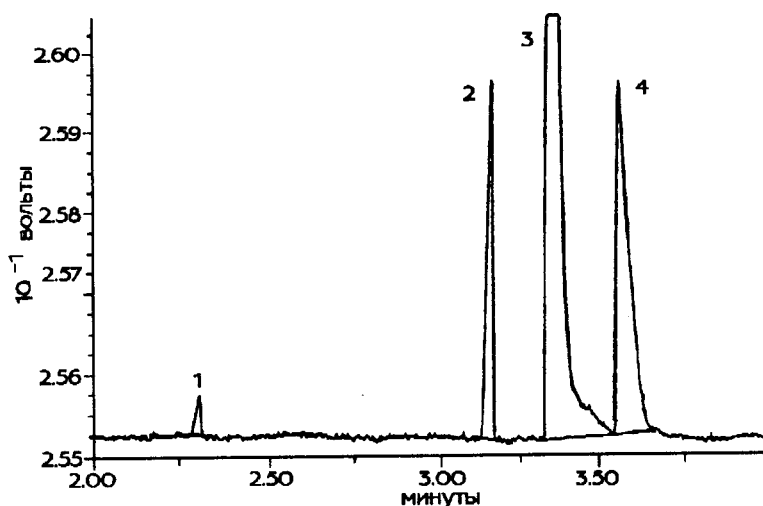


Рис. 52. Разделение катионов в воде, взятой с поверхности озера Байкал. Условия: прибор КЭ: Millipore Waters Quanta 4000; капилляр: 75 мкм, 54/60 см; поле: 446 В/см; буфер - 5 мМ имидазол/серная кислота, pH 4.5; ввод пробы гидростатический, 30 с. Непрямое детектирование, 214 нм. Проба - байкальская вода: 1 - калий, 2 - натрий, 3 - кальций, 4 - магний. Количественные результаты приведены в таблице 20.

В качестве другой пробы, для которой имелись в наличии контрольные данные, полученные другими аналитическими методами, изучали воду из лесного родника. Для минеральной воды лесного источника результаты анализов, полученные всеми тремя методами, приведены в таблице 20. Дополнительно здесь же приведены концентрации ионов, имеющиеся на этикетке бутылок с этой водой.

Таблица 20.

*Количественные результаты КЭ по сравнению с данными ИОХи
ААС (все концентрации приведены в ppm).*

Проба	Метод	Калий	Натрий	Кальций	Магний
Байкальская вода	ВЭЖХ	0.5	5.3	15.9	3.3
	КЗЭ	0.6	3.1	14.5	2.9
	ААС	1.1	3.4	14.6	3.3
Лесной родник	ВЭЖХ	1.2	3.2	4.7	0.8
	КЗЭ	1.6	3.2	4.1	1.1
	ААС	2.6	3.4	4.5	0.6
	БЭ	2.0	3.6	3.8	0.7
Яблочный уксус	ВЭЖХ	925	69	92	52
	КЗЭ	1125	74	114	64

БЭ - данные, приведенные на бутылочной этикетке

Более проблематичен анализ катионов в крови. Размеры красных кровяных шариков составляют 7:5х2 мкм и граничат с размерами частиц, которые можно вводить в КЭ без проблем. После разжижения свежей крови в 100 раз эта проба уже не в состоянии коагулировать. Красные и белые кровяные тельца крови не допускают прямого ввода пробы в методе ВЭЖХ. Содержание белков в этих разжиженных растворах всегда выше 0.7 г/л, так что белки составляют существенную часть пробы. Несмотря на это, разделение катионов методом КЭ вследствие их очень высокой подвижности по сравнению с компонентами пробы не представляет большой проблемы.

Вследствие высокой чувствительности, детектирование ионов удается провести даже в таком разжиженном растворе. Значения концентраций, определенные по сравнительному методу с внешней сравнительной кривой, соответствуют литературным данным. Для калия найдено значение 6.8 мг-экв/л (литературное значение 5 мг-экв/л), для натрия - 147 мг-экв/л (литературное значение 150 мг-экв/л), для кальция - 3.4 мг-экв/л (литературное значение 2 мг-экв/л) и для магния - 5.4 мг-экв/л (литературное значение 3 мг-экв/л).

Белки в растворе все же нарушают воспроизводимость разделения. На рис. 54 показаны времена миграции и площади пиков кальция для первых восьми вводов пробы.

В результате адсорбции белков, которые при каждом вводе пробы достигают капилляра, силанольные группы на стенках капилляра, ответственные за ЭОП, все более и более блокируются. По этой причине ЭОП замедляется, и ионы движутся к детектору медленнее. Уменьшение скорости движения напрямую отражается на площади пиков. С увеличением времени миграции ионы медленнее проходят через детектор, из-за чего площадь пиков растет. Этим объясняется ход кривых зависимости площади пика от времени миграции, приведенных на рис.54.

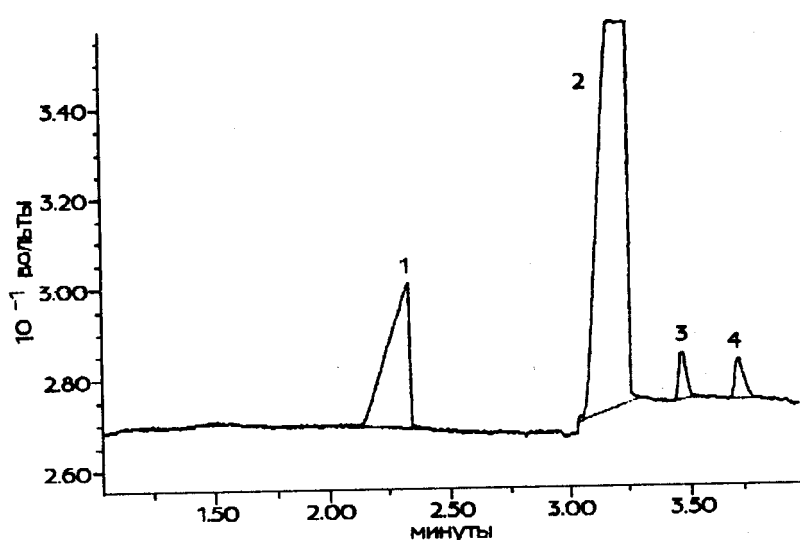


Рис. 53. Разделение разжиженной пробы крови. Условия: прибор КЭ - Millipore Waters Quanta 4000; капилляр: 75 мкм, 50/57 см; поле: 446 В/см, буфер: 5 мМ имидазол/серная кислота; ввод пробы гидростатический, 30с, не прямое детектирование 214 нм; проба: суспензия 50 мкл крови в 5 мл воды; 1 - калий, 2 - натрий, 3 - кальций, 4 - магний.

Нормировка площади пика на время миграции является лишь вычислительным приемом с результатами анализа. Однако, причина изменения времени миграции все же остается. Несмотря на это, путем такой нормировки ОСО площади пика уменьшается с 6.2% до 2.8%. Приемлемым решением этой проблемы является подготовка капилляра перед каждым пуском. В анализах, описанных до настоящего времени, для кондиционирования капилляра применяли только промывание разделяющим буфером в течение 3 мин.

Для удаления белков из капилляра после каждого разделения во второй серии измерений капилляр сначала промывали в течение 5 минут 0.1 М NaOH и затем 5 минут разделяющим бусером. Этим способом кондиционирования можно было удалять со стенок капилляра мешающие вещества, внесенные пробой, и в конце концов восстановить свойства капилляра новым буфером. Характеристическая кривая зависимости площади пика от времени миграции в этих случаях не имеет наклона, времена, как и площади пиков, колеблются произвольно. Воспроизводимость площади пика для кальция составляет после 8 вводов пробы 2.0%. Если площадь нормировать дополнительно на время, это значение составляет 1.5%.

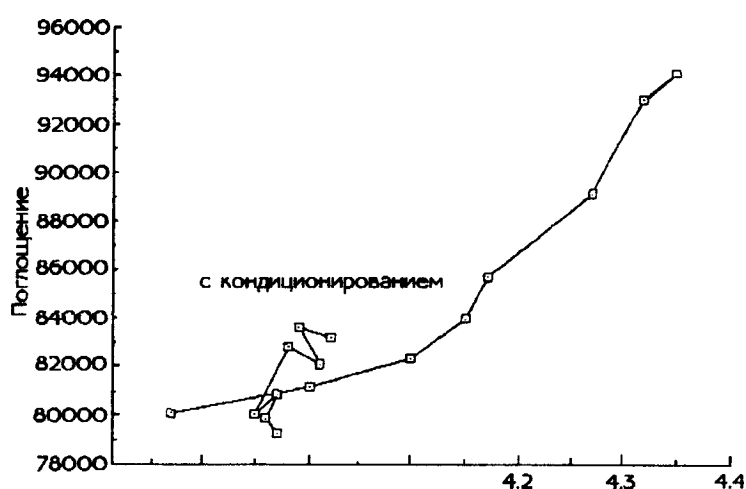


Рис. 54. Разделение разжиженной пробы крови, характеристические кривые времени миграции/площади пика для проверки воспроизводимости с и без кондиционирования капилляра. Условия аналогичны приведенным на рис. 53.

Амины также могут легко протонироваться, и, так же как ионы металлов или аммония, их можно легко разделять. Типичные значения pK_s для алифатических аминов лежат в области от 9.5 до 10.8. На рис. 56 в качестве примера представлено разделение ионов металлов, аминов и аминокислот. И в данном случае не прямое УФ-детектирование достигается имидазольной буферной системой. Благодаря высокому разрешению пиков, все вещества, как видно из рисунка, отделены друг от друга на уровне базисной линии.

8.3. Сопоставление методов прямого и непрямого УФ-детектирования

Сопоставление нижней границы детектирования (НГД) и верхней границы линейной области удается провести при анализе некоторых аминов, плохо поглощающих в УФ-области. Аналогичные измерения со щелочными или щелочно-земельными ионами провести невозможно из-за их слишком малого УФ-поглощения. Из данных, приведенных в таблице 21, видно, что эти ионы при 200 нм можно детектировать прямым способом. В боратном буфере анализ длится до 5 мин. Непрямым УФ-детектированием при 254 нм с эфедрином в качестве буфера нижняя граница детектирования уменьшается в 50 раз (примерно до 1 мг/л). Линейная область в методе прямого УФ-детектирования распространяется от 1.4 до 1.6 десятичных порядков, а при непрямом УФ-детектировании - от 1.7 до 2.0 десятичных порядков.

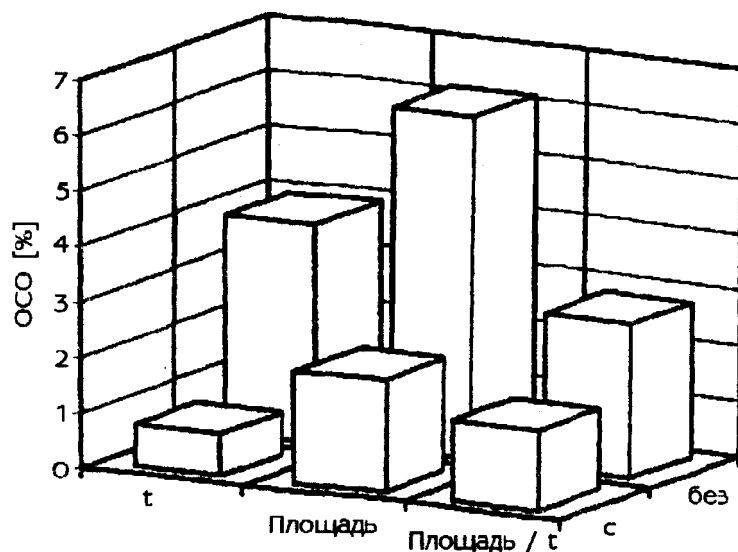


Рис. 55. Разделение разжиженной пробы крови, воспроизводимость времен миграции, площади пика и нормированные площади пика. Условия аналогичны приведенным на рис. 53.

Из этого видно, что и при непрямом детектировании можно работать в линейной области.

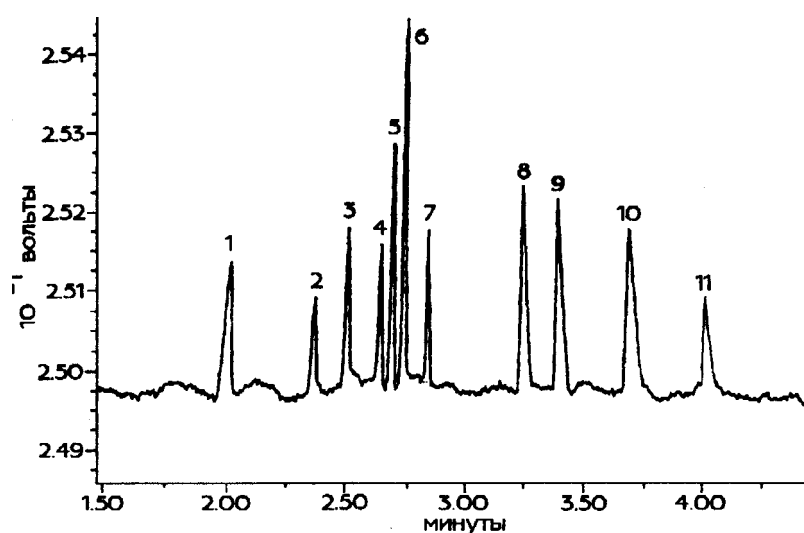


Рис. 56. Разделение низших аминов и ионов металлов. Условия: прибор КЭ Mill/pore Waters Quanta 4000; капилляр: 75 мкм, 50/58 см; поде: 436 В/см, буфер: 5 мМ имидазол/серная кислота, рН 4,7; ввод пробы гидростатический, 30 с, не прямое детектирование 214 нм, проба: 1.0- 2.5 ppm; 1 - кадий, 2 - натрий, 3 - диметиламин, 4 - триметиламин, 5 - кальций, 6

-магний, 7 - литий, 8 - диэтиламин, 9 - триэтиламин, 10 - диэтанолламин, 11 - триэтанолламин.

Таблица 21.

Нижняя и верхняя границы линейной области (в ppm) в методиках прямого и непрямого детектирования.

Детектирование	Прямое УФ 200 нм		Не прямое УФ 254 нм	
	НГД	Область линейности	НГД	Область линейности
Этиламин	50	2000	1	50
Диэтиламин	50	2000	1	70
Триэтиламин	20	500	1	100

Условия разделения: прибор КЭ - Beckman P/FCE 2000; капилляр 75 мкм, 50/57 см;

поле 439 В/см; ввод пробы давлением 8 с, буфер при прямом УФ-детектировании - 50 мМ борат, pH 9.5, при не прямом УФ-детектировании - 5 мМ эфедрин/серная кислота, pH 7.5; прямое УФ-детектирование - 200 нм, не прямое - 254 нм; пробы - амины в воде.

9. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) белков

В КЗЭ белков между молекулами пробы и стенками капилляра могут возникнуть сильные, в основном электростатические, взаимодействия. Они происходят между отрицательно заряженными сила-нольными группами поверхности и положительно заряженными функциональными группами пробы. Некоторую дополнительную роль могут играть также неспецифические взаимодействия с образованием водородных мостиков или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Адсорбция молекул белков на стенках капилляра может отрицательно сказываться на разделении при КЭ и поэтому нежелательна. Она приводит к ухудшению воспроизводимости времен миграции, уширению и асимметрии пиков, и даже к необратимой адсорбции компонентов пробы. Поэтому при работе с немодифицированным капилляром рекомендуется после каждого проведенного разделения при вводе пробы из биологических матриц основательно промыть капилляр (например, NaOH). При этой операции молекулы, адсорбированные на стенках капилляра, удаляются, и воспроизводимость системы улучшается. Существует несколько возможностей подавления нежелательных взаимодействий между белками и стенками капилляра.

9.1. Оптимизация разделения в немодифицированных капиллярах

9.1.1. Значения pH

При значениях pH выше изоэлектрической точки (pI) белки существуют в анионной форме, то есть имеют те же заряды, что и стенки капилляра и во время разделения отталкиваются от них. Поскольку очень многие белки имеют значения pI , лежащие в области от нейтральных до слегка кислых, буфер для КЭ должен иметь явно щелочные значения pH (pH 9 - 11). Однако, в случае сильно основных белков ($pH > 10$) эта возможность достигает своих естественных границ. Кроме этого, в данном случае дают себя знать высокая электропроводность применяемого буфера и отрицательно сказывающееся явление денатурирования, которое может возникнуть в этих характерных условиях. На рис. 57 показано разделение белков в немодифицированном капилляре при pH 11.5.

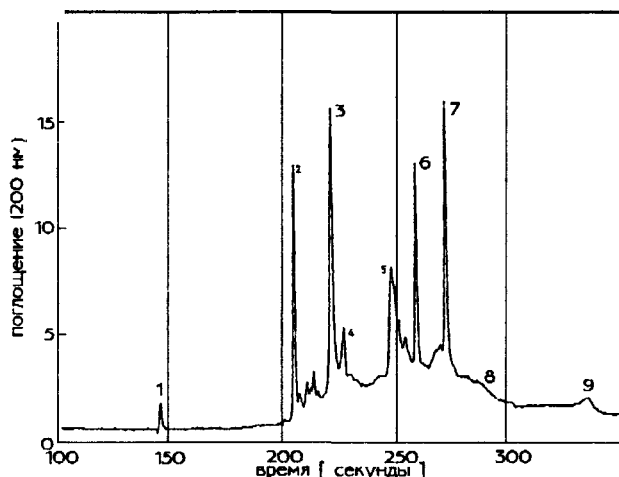


Рис. 57. Разделение белков при pH 11.5 в немодифицированном капилляре. Буфер: 100 мМ борат, pH 11.5; пробы: 1 - DMF, 2 - РНК крупного рогатого скота, 3 - миоглобин кита, 4 - миоглобин лошади, 5 - кональбумин, 6 - β_2 - лактоглобулин, 7 - бычий сывороточный альбумин (BSA), 8 - ферритин, 9 - α -амилоглюкозидаза.

В кислой области pH ($pH < 2$) адсорбция белков также может уменьшаться вследствие протонирования силанольных групп и устранения тем самым отрицательного заряда поверхности. В данном случае проблемы представляют очень малый ЭОП и возможная денатурация белков. Использование крайних значений pH для анализа биополимеров ограничивает селективность системы, поскольку разница в зарядах анализируемых веществ заметно уменьшается. Кроме того, выгодно иметь в качестве свободно изменяемого параметра значение pH. Скорость движения заряженных проб в КЗЭ определяется степенью их ионизации, которую можно легко регулировать величинами pH. Наилучших результатов можно достичь, выбирая высокие

концентрации буфера и область pH чуть ниже 3. На рис. 58 представлены некоторые тестовые буферы для разделения основных белков. Повышение pH от 2.4 до 4.7 при концентрации буфера 25 mM приводит к явному уменьшению интенсивности пика, в то время как при повышении концентрации свыше 50 mM (pH 4.3) до 100 mM (pH 4.2) наблюдается заметное увеличение интенсивности пика.

И для этих буферов с высокой концентрацией можно улучшить проявления пика уменьшением значения pH до 2.9. Однако в данном случае, вследствие крайне высокой подвижности протонов (кислые значения pH), резко увеличивается ЭОП.

Поэтому дальнейшая оптимизация в сторону более кислых значений pH удастся только с одновременным разбавлением разделяющего буфера, которое вызывает уменьшение интенсивности пика. Кроме того, работа в очень кислой области (pH 2.3) приводит к уменьшению селективности. Этот способ оптимизации разделения стандартных белков показан на рис. 58.

9.1.2. Добавление солей к буферу

В основе взаимодействия белков со стенкой лежит в основном механизм катионного обмена. Это возможно, поскольку и в случае отрицательного полного заряда молекулы (особенно при основных pH) всегда имеются в наличии катионные группы, например аргинин-радикалы в цепочках полипептидов. Поэтому путем добавления солей щелочных металлов (например сульфата калия) к буферу, как и в случае ионообменной хроматографии, достигается конкуренция кулоновскому притяжению и вызванное этим притяжением взаимодействие белок - стенка явно уменьшается. Следуя этой концепции, можно для стандартных белков в широкой области pI (pI 5-11) достичь эффективности 50000-100000 тарелок на метр. И в этом случае недостатком является сравнительно высокая электропроводность буфера (эффективное охлаждение!) которая вынуждает использовать поля низкого напряжения (5 кВ) и длинные капилляры с маленьким внутренним диаметром (25 мкм). Кроме того, большие ионные силы уменьшают как ЭОП, так и ξ -потенциал пробы, что вместе с вышеназванными факторами приводит к длительным временам анализа.

В качестве буферных веществ могут служить также цвиттерионные молекулы (внутренние соли), которые обладают большой буферной емкостью, но не вносят значительного вклада в общую электропроводность системы. Цвиттерионы могут образовывать ассоциаты с белками и поверхностью капилляра и, тем самым, уменьшать адсорбцию белков. За счет применения аминосульфата, аминосульфата и, в последнее время, фосфонийсульфоната в очень высоких концентрациях в качестве добавок к фосфатному буферу в нейтральных условиях можно разделять как основные, так и кислые белки.

9.1.3. Добавка органического модификатора к буферу

Недостаток заключается в возможной денатурации белка.

9.1.4. Применение буферных добавок для разделения белков (динамическое наполнение капилляров)

Простейший метод модифицирования поверхности кварцевого капилляра состоит в добавлении к буферному раствору такого компонента, который предпочтительнее адсорбируется на поверхностных силанольных группах. Формирование такого адсорбционного слоя дополнительно влияет на ЭОП и уменьшает адсорбцию вследствие гидрофобного или электростатического отталкивания. Разделяющие системы, применяемые в основном для разделения белков в немодифицированных капиллярах, приведены в таблице 22.

Добавка ПАВ ведет, прежде всего, к увеличению эффективности разделения белков. При этом взаимодействия между молекулами различных ПАВ и пробами могут быть очень различными. С одной стороны, можно конечно обсуждать, вопрос адсорбции детергентов на биомолекулах. Следствием этого является улучшение растворимости и увеличение гидрофильного характера пробы. Наряду с этим, большую роль играет также адсорбция ПАВ на стенках капилляров. Это приводит как к увеличению

При использовании катионных детергентов, например, ЦТАБ, формируется двойной электрический слой, в котором положительные заряды направлены внутрь капилляра. Тем самым достигается обращение ЭОП. Вследствие того, что поверхность заряжена положительно, адсорбция катионных белков тормозится электростатическим отталкиванием от стенки. При этом в случае основных белков достигается большое число ступеней разделения и симметричность пиков. Вообще следует обращать внимание на то, чтобы добавленным детергентом не превысить критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ).

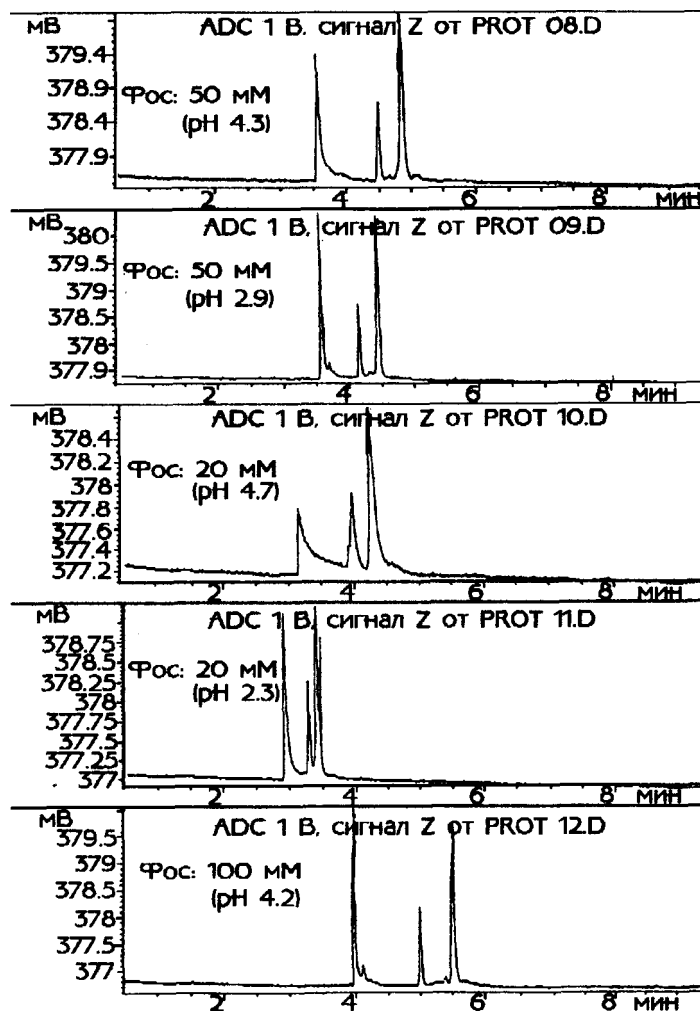
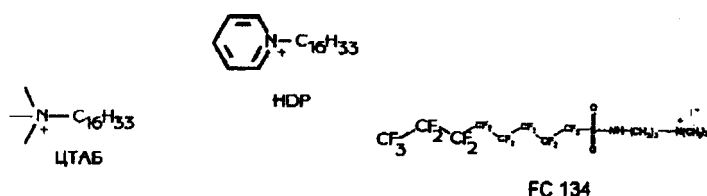


Рис. 58. Разделение стандартных белков в различных буферных системах. Условия: прибор самодельный с быстросканирующим детектором, капилляр 50 мкм, 37/44 см, поле: 341 В/см; ввод пробы гидродинамический, 15 см²с; детектирование 214 нм; буфер фосфатный; проба: цитохром С, лизоцим, ри-бонуклеаза А.

Разделение белков с помощью буферных добавок в немодисциплированных капиллярах.

Буфер	C (мМ)	PH	Pi	N .(10 ³ /м)
Трицин/КС!	10/20	8.3	5-7	500
СНЕ8/Кг304/ЭДТА	100/250/1	9.0	5-11	100
Фосфат/бетаин/Кг804	40/2000/100	6.7	9-11	300
Фосфат/Sulton	100/1000	7.0	5-11	300
1,3-диаминопропани/К2304	40/20	3.5	9- 11	300
Фосфат/BRU 35	10/Юррт	7.0	3-11	100
Фосфат/FC 134	50/100 ррт	7.0	7-11	300
Борат/ДДСН	100/0.5 %	10.0	4-6	-



Неионные ПАВ, например BRIJ 35, также могут быть использованы для уменьшения взаимодействия белок-стенка. Для еще большего увеличения адсорбции этих детергентов на поверхности капилляра и полного подавления ионных взаимодействий с силанольными группами, стенка обрабатывается дополнительно условно "толстым" покрытием С 18.

Принципиально должна существовать также возможность использования в КЭЭ испытанного в классическом электрофорезе и в жидкостной хроматографии анионного ПАВ ДДСН. Однако в систематических исследованиях кислых белков оказывается, что добавка ДДСН в количествах от ррт до одного процента к пробе и к буферу приводит к очень неопределенным результатам. В общем случае не улучшается ни эффективность, ни селективность, а даже наблюдается некоторое ухудшение этих характеристик. Возможным объяснением этого может быть хорошо известное действие денатурации, оказываемое ДДСН на белок. Наряду с этим, в наблюдаемой потере селективности большую роль играет, конечно, адсорбция ПАВ на биомолекулах и связанное с этим появление заряда пробы. Первоначальная структура заряда белков может полностью исчезнуть или перекрываться этим эффектом, так что разделение в электрическом поле произойдет только лишь по адсорбированным зарядам детергентов.

Этот эффект был использован в ДДСН-ПААГ-электрофорезе для определения ММ белков. Этот же способ может быть реализован в капилляре и позже будет описан в главе "Капиллярный гелевый электрофорез".

Резюмируя, можно отметить, что в случае добавок детергентов для разделения белков в КЭ многообещающим представляется использование в качестве динамических покрытий в основном неионных ПАВ, т. к. они лишь незначительно изменяют структуру заряда пробы. Конечно, этот метод включает совместное действие химического модифицирования поверхности и динамического покрытия, в результате чего преимущества доступности и простоты применения буферных добавок в конце концов теряются.

Неблагоприятную адсорбцию белков на поверхности капилляра можно уменьшить также добавками низших полиаминов, например, 1,3-ДАП. При этом получают высокую эффективность, однако из-за большой собственной электропроводности буфера следует использовать электрические поля низкой напряженности. Действие буферных добавок, вероятно, частично объясняется необратимой адсорбцией на стенках капилляра. Поэтому одновременно со снижением адсорбции пробы происходит резкое уменьшение электроосмоса. В качестве примера на рис. 60 показано разделение стандартных белков.

9.2. Использование капилляров с модифицированной поверхностью

ЭОП можно регулировать также с помощью химического модифицирования поверхности капилляра. Одновременно с этим могут уменьшаться возможная адсорбция компонентов пробы на поверхности капилляра и улучшаться воспроизводимость анализов. Для химического покрытия капилляров можно использовать различные способы. Химически модифицированные капилляры коммерчески доступны.

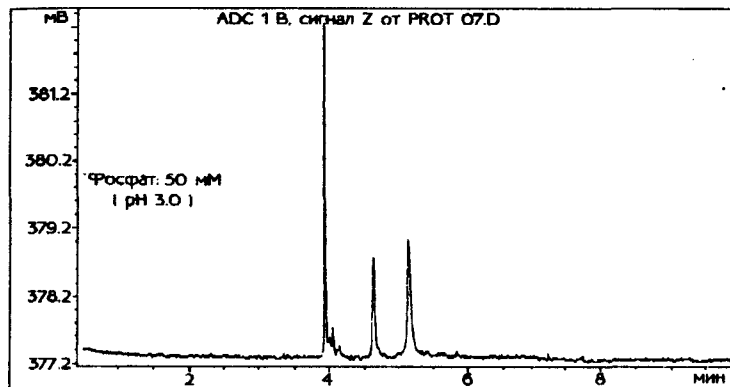


Рис. 60. Разделение стандартных белков в буферной системе ДАП. Условия: капилляр 75 мкм, 37/44 см, поле: 272 В/см; детектирование: 214 нм, фосфатный буфер со 100 мМ ДАП, pH 3.0; проба: цитохром С, лизоцим, рибонуклеаза А.

9.2.1. Типы покрытий поверхности в КЭ

Принципиально различаются два метода нанесения слоев на поверхность. Сначала использовали метод традиционной химии силанов, при котором моно-, ди-, или трисиланы присоединяются к силанольным группам на стенках капилляров с образованием силоксановых связей. Функциональные группы, введенные сначала поверх силанов, можно использовать еще и на второй стадии для окончательного модифицирования поверхности.

Перечень описанных к настоящему времени в литературе т. н. общепринятых типов покрытий, приведен в таблице 23. Основным ограничением метода является недостаточная стабильность силоксановых связей по отношению к гидролизу в щелочных условиях. Этот метод достаточно хорошо известен в жидкостной хроматографии.

Недостаток этого метода можно обойти, применяя способы покрытия стенок капилляра полимерами, которые представляют собой вторую большую группу используемых покрытий. Здесь опять различают два способа:

- поверхность предварительно обрабатывается классическим способом химии силанов и при этом на нее наносятся т.н. якорные группы, на второй стадии они могут сополимеризоваться с соответствующими мономерами или олигомерами;
- на соответствующий носитель адсорбируется первичный полимер, который затем сополимеризуется *in situ* и поперечно связывается в сетку.

Таблица 23 .

Методы покрытия капилляров в разделении белков. Обычные покрытия

Функциональные группы	Область pH	Применение
Триметилсилил-	7	Маленькие молекулы
Триметилсилил-	9	МЭКХ
Обращенная фаза C8	9	Белки
Обращенная фаза C 18	9	Белки
Полиэтиленгликоль-	от 3 до 5	-"
Диол-	от 3 до 5	-"
Глицеро-глицид-оксипропил-	5	."
Мальтоза	от 3 до 7	."
Арилпентафтор-	7	."
Альфа-лактальбумин	8	к

Поверхности с нанесенными слоями полимеров проявляют более высокую pH-стабильность в щелочах при pH около 9.

Недостаток покрытия полимерами заключается в сильной гидрофобности (адсорбция белков!), так что такого рода фазы часто используются в присутствии неионных или внутреннеионных детергентов. Сопоставление применяемых до настоящего времени полимерных покрытий приведено в таблице 24.

Таблица 24.

Методы покрытия капилляров в разделении белков Полимерные покрытия

Функциональные группы	Область pH	Применение
Линейный полиакриламид	от 2 до 8 (до 10*)	Белки ИЭФ
Полиэтиленимин	от 3 до 11	Белки
1 -винил-2-пирролидин	от 2 до 6	Белки
Поли(метилглутамат)	7	Белки
Полиметилсилоксан (OV1)	7	МЭКХ

Полиэтиленгликоль	7	МЭКХ
Полисилоксан/бетациклодекстрин	7	Хиральное разделение

*) указанная в литературе область стабильности или наивысшее используемое в опытах значение pH.

9.2.2. Изготовление химически модифицированных капилляров

9.2.2.1. Предварительная обработка кварцевых капилляров

На основании многолетнего опыта изготовления кварцевых капилляров с покрытием для ГХ известно, что перед собственно химическим модифицированием очень полезно провести предварительную обработку материала. Капилляры, применяемые в КЭ, обычно изготавливаются либо из "некондиционных" трубок, применяемых в ГХ, либо из отходов производства световодов. Поэтому качество материалов различных трубок относительно их шероховатости и загрязнения адсорбированными ионами металлов очень различается.

Большинство описанных в литературе методов заключаются в обработке капилляров щелочами или кислотами для улучшения смачиваемости поверхности. Кроме этого, поверхность также химически истощается, и образуются новые силанольные группы. Это выгодно, поскольку дополнительно образуемые SiOH-группы играют роль центров связи с покрытием и тем самым помогают улучшению химического обмена со стенкой капилляра. Эта стадия заканчивается обычно нейтральной промывкой в дистиллированной воде и сушкой в потоке газа при повышенных температурах (80-200 °C).

Не все авторы указывают на необходимость предварительной обработки для успешного покрытия капилляров.

9.2.2.2. Методы покрытия

В ГХ известны два основных метода модифицирования поверхности капилляров. Первый метод - это т.н. "метод динамического покрытия". В этом случае порция жидкости, состоящая из раствора стационарной фазы, пропускается через капилляр с помощью газового потока. Важными условиями при этом являются смачиваемость стенок растворителем, малый поверхностный заряд раствора и, прежде всего, отсутствие пыли. В качестве растворителя применяют в основном дихлорметан и пентан.

Гомогенность и толщина полученного покрытия определяются в первую очередь концентрацией раствора. Полуэмпирическая оценка толщины пленки d_i может быть проведена по следующему уравнению:

$$d_i = Cr/200 (\eta U/\sigma)^{1/2},$$

где C - концентрация в об.%, r - радиус, U - линейная скорость, η - вязкость, σ - поверхностное натяжение.

Для 10% раствора в области реализуемых скоростей достигается толщина пленки от 0.2 до 1 мкм. Процесс покрытия заканчивается сушкой в инертной атмосфере и, при необходимости, полимеризацией или поперечным сшиванием.

При статическом методе капилляр также заполняется разбавленным раствором стационарной фазы. После запаивания одного конца капилляра пары растворителя пропускаются через другой конец при нагревании и/или под давлением. Этот метод предъявляет существенно более высокие требования к аппаратуре и методике. Предпосылкой гомогенного покрытия являются, в частности, постоянная температура и тщательное дегазирование.

Несмотря на то, что оба метода очень надежны в ГХ, до настоящего времени в КЭ они применяются довольно редко. Большинство авторов ограничиваются тем, что, как в ЖХ, наносят силаны за счет выдерживания в растворе и нагревания. Тем самым, коммерчески доступные капилляры обладают худшей стабильностью и воспроизводимостью покрытия. Кроме того, при этом теряется важная информация о модифицированной поверхности (толщина пленки и др.).

9.2.3. Характеристики заполненных капилляров в КЭ

В ГХ и ЖХ стандартная фаза характеризуется с применением многочисленных стандартных тестов и тестовых смесей. Кроме того, в ЖХ существуют многочисленные независимые физико-химические методы, например, элементный CHN-анализ, ИК-фурье-спектроскопия или ЯМР, способные дать информацию о модифицировании поверхности. Использование в КЭ трубок небольшой длины (<1 м) с крайне малым внутренним диаметром (<100 мкм) и, как следствие, малой внутренней поверхностью (<1 см²) делают невозможным применение инструментальных физико-химических методов.

Исходя из этого, в качестве характеристики покрытия капилляров используется изменение ЭОП, вызванное покрытием. Вследствие того, что в большинстве случаев покрытия делаются для подавления взаимодействия белок-стенка, естественно, что в качестве меры качества модифицирования поверхности может служить разделение стандартных смесей белков.

Характеристики неполярных или гидрофобных покрытий можно получить с помощью газохроматографических измерений. Для определения толщины пленки исследуются времена удерживания *n*-нонана как стандартного вещества. Для характеристики оставшихся силанольных групп служат времена удерживания различных полярных веществ.

9.3. Обзор важнейших химических покрытий

9.3.1. Общепринятые покрытия

9.3.1.1. Алкил-силановые покрытия

Изготовление. Применение и реакционная способность моно-, ди- и трифункциональных алкилсиланов уже давно известны в ГХ и ВЭЖХ, поэтому здесь подробно на этом останавливаться не будем. Получаемая в результате поверхность имеет более или менее гидрофобный характер ("обращенная фаза"), в зависимости от длин цепочек нанесенных алифатических остатков. Благодаря слабой реакционной способности алкокси-силанов их можно наносить из водных растворов.

Электроосмос. При добавлении поверхностных силанольных групп с нейтральными (незаряженными) алкилсиланами ЭОП уменьшается. На рис. 61 представлены зависимости электроосмоса от значения pH буфера для кварцевого капилляра, покрытого C8 и C18, по сравнению с исходным капилляром. Видно, что поток уменьшается примерно на 40% от исходного значения, и в этом случае трудно определить точку перелома. Меньший поток в C8-капилляре вероятно объясняется лучшим покрытием поверхности, т.к. "щетка" C8 предъявляет меньше стерических требований, чем C18.

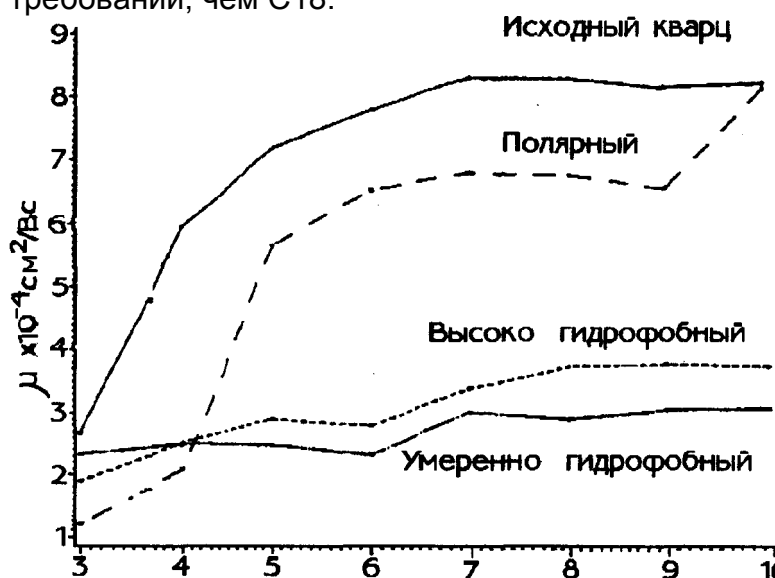


Рис. 61. ЭОП/pH-характеристики различных покрытий (типов "щетки").

Стабильность. Из применения в хроматографии известно, что алкилсилановые покрытия стабильны по отношению к гидролизу только при pH 7. На рис. 62 показано изменение времени миграции некоего нейтрального маркера в течение 80 опытов при pH 7 для названных выше капилляров. Модифицированные капилляры показывают

явный спад времени движения в течение первых 20 опытов. Возможные объяснения этого заключаются либо в потере несвязанного материала, либо в частичном гидролизе алкильной "щеткой" на поверхности. После этого состояние капилляра, покрытого по крайней мере C8, стабилизируется.

Применимость. В капиллярах с покрытиями C8 и C18 может быть проведено разделение белков. Однако покрытия алкилсиланами имеют два больших недостатка: с одной стороны - гидрофобный характер алкильной "щеткой", с другой стороны - неполное экранирование поверхностных силанольных групп, которые все еще взаимодействуют с белками.

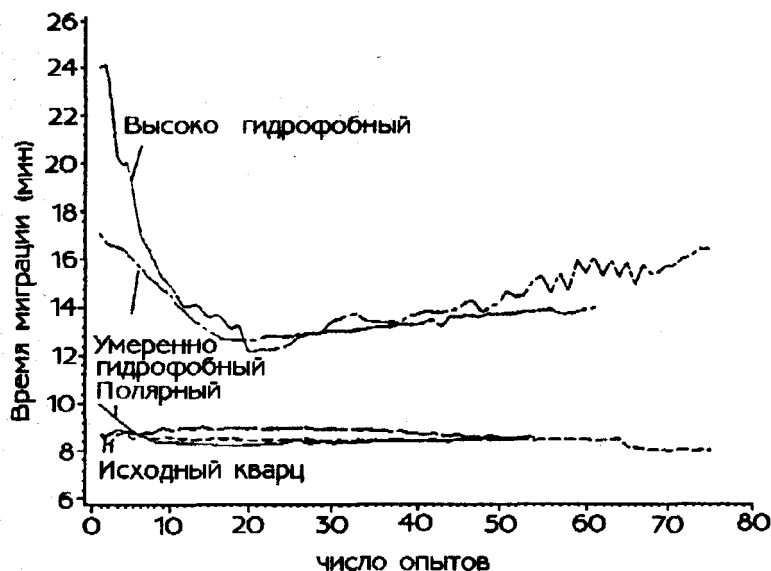


Рис. 62. Стабильность покрытий (типы "щеток"), литература Supelco.

9.3.1.2. Арилпентафторидные покрытия

Изготовление. Синтез проводится по описанным стандартным методам с применением двухстадийной реакции: после обработки стенки гамма-аминопропилтриметоксисиланом нанесенные аминогруппы обмениваются с пентафторобензоилхлоридом в сухом толуоле.

Электроосмос. Особенность арилпентафторидного (АПФ) покрытия заключается в том, что, в отличие от многих других покрытий, при нейтральном pH и средних ионных силах появляется отчетливый ЭОП (0.5 мм/с).

Применимость. Как показывают специальные хроматографические опыты, АПФ-покрытия также относятся к гидрофобным. Поэтому АПФ-капилляры можно с успехом использовать при pH 7 для разделения белков. Для тестовых смесей с белками, которые перекрывали область pH от 6.9 до 11, получали эффективность в многие сотни тысяч теоретических тарелок на метр (рис. 63). Благодаря вкладу электроосмоса в условиях проводимого анализа можно разделять как катионные, так и анионные белки за один проход.

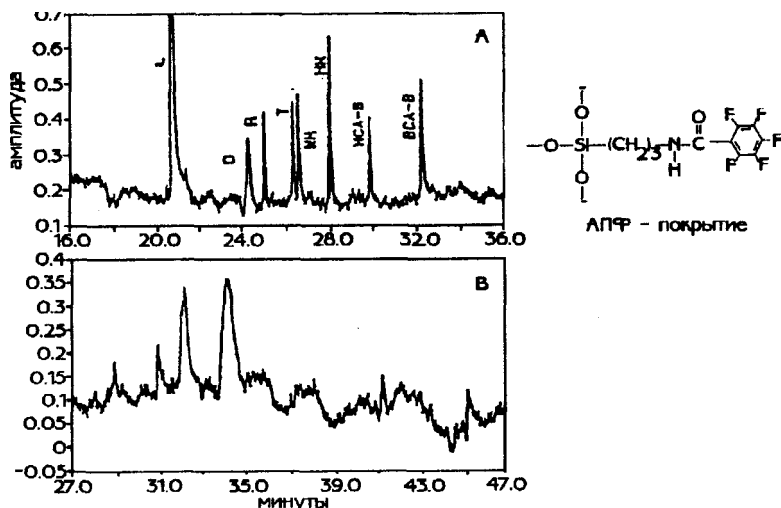


Рис. 63. Структура АПФ-покрытия. Пример разделения белков: (A) с помощью покрытия АПФ; (B) - в капилляре из плавленого кварца; буфер - 200 mM KCl, pH 7; пробы: L - лизоцим, D - ДМСО, R - РНК крупного рогатого скота, T - трипсиноген, WM - миоглобин кита, HM - миоглобин лошади, HSA-B - карбоксиангидраза В человека, BSA-B - карбоксиангидраза крупного рогатого скота.

9.3.1.3. Гидрофильные гидрокил- и полиэфирные покрытия

Изготовление. В ЖХ для разделения белков в основном используются гидрофильные фазы, например, с диол-полиэтиленгликолем (ДПЭГ) или полисахаридами. Кварцевые капилляры также можно модифицировать этими функциональными группами.

В данном случае для синтеза используются двухступенчатые реакции, на первой стадии которых применяют, например, глицидсилан. Он может впоследствии либо гидролизаться диолом, либо соединиться с глицерином или полиэтиленгликолем (рис. 64). Нанесение углеводов происходит на первой стадии с помощью аминифункциональных групп, с которыми впоследствии можно связать мальтозу с использованием, например, циано-боргидридного катализа.

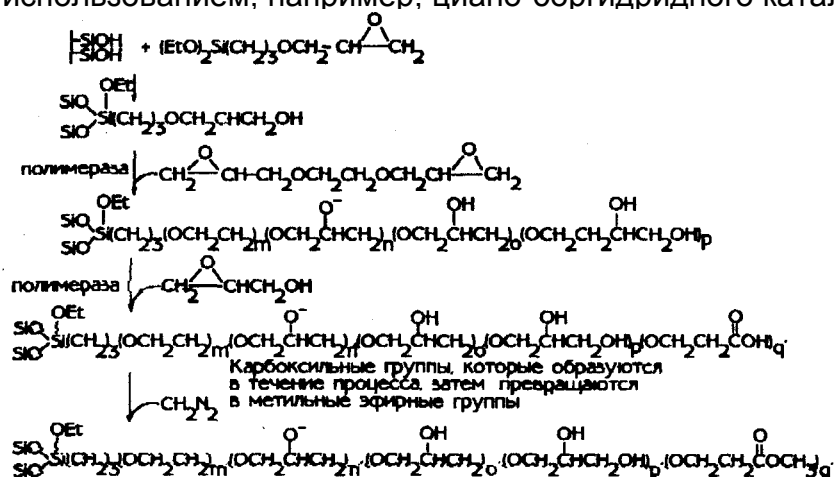


Рис. 64. Схема синтеза ПЭГ-покрытия.

Электроосмос и стабильность. При покрытии диолом и полиэтиленгликолем (ПЭГ), как и ожидалось, электроосмос резко уменьшается. (В случае диола $m_{ЭОП}=0.1$ см²/кВс для 50 мМ фосфата и pH 6). Рабочая область для таких капилляров ограничивается значениями pH от 3 до 5. Долговременная стабильность в этих условиях достигает нескольких месяцев. При покрытии мальтозой возможна работа в области pH от 3 до 7. Вследствие того, что при нанесении аминосиланов с мальтозой реакции обмена подвергаются не все функциональные аминогруппы, при низких значениях pH поверхность заряжается положительно.

Это приводит к обращению направления ЭОП в кислотах. Кроме того, хранение

капилляров в этом случае возможно только при добавлении консервантов, защищающих покрытие от повреждения микроорганизмами.

Применимость: Покрытия на основе диола, ПЭГ и мальтозы в основном используются для разделения белков в КЭ. Разделение стандартных белков показано на рис. 65.

В заключение можно отметить, что и в случае гидрофильных покрытий капилляров или на первой стадии синтеза введенной "подложки" поверхность покрывается недостаточно плотным слоем, так что зачастую взаимодействия поверхности с пробой подавляются не полностью.

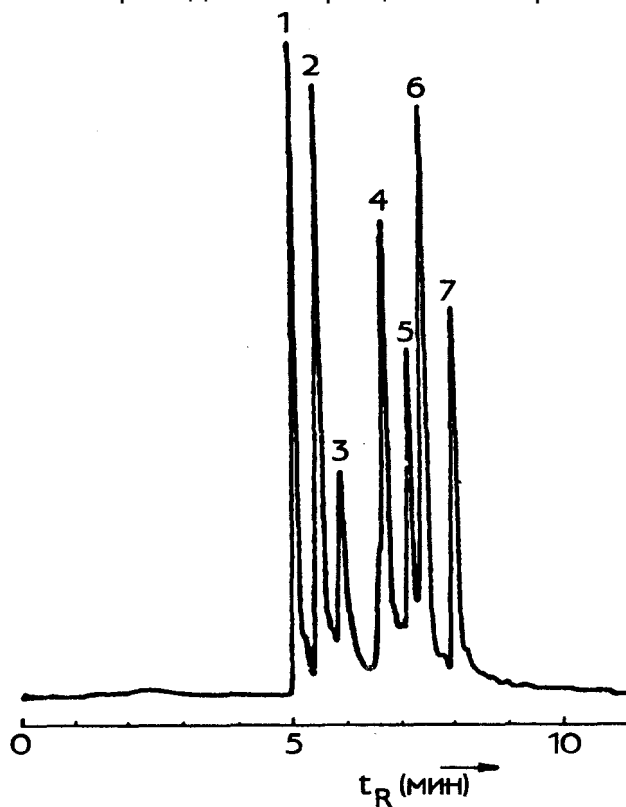


Рис. 65. Разделение белков в капилляре,

покрытом ПЭГ. Буфер: 30 мМ фосфат, рН 3.8; пробы: 1 - цитохром С, 2 - лизоцим, 3 - миоглобин, 4 - трипсин, 5 - РНК, 6 - трипсиноген, 7 - химотрипсиноген.

9.3.1.4. Покрытия на основе белков

Изготовление. Внутренние стенки капилляров можно покрыть не только углеводородами, но и белками, например, альфа-лактальбумином. Для того, чтобы свободные альдегидные группы служили центрами связи с белками, в капилляре, модифицированном аминогруппами, сначала проводится реакция обмена с глутардиальдегидом. Впоследствии эти группы реагируют с введенным в капилляр белком.

Электроосмос. Покрытия на основе белков показывают интересную зависимость ЭОП от рН. Вследствие того, что белки имеют амфотерные свойства, выше своих значений pI они существуют в анионной, а ниже - в катионной формах. Если значения рН буфера соответствуют значениям pI , то белки незаряжены. Следовательно, в этой точке электроосмос должен падать до нуля, или, соответственно, менять направление на противоположное при переходе через эту точку. Таким образом, в принципе существует возможность подбором определенного белка или амфотерных молекул регулировать силу и направление ЭОП.

9.3.2. Полимерные покрытия

9.3.2.1. Покрытия на основе линейных полиакриламидов

Поперечносшитые полиакрилимидные гели оказались прекрасными носителями и разделительными матрицами для электрофоретического разделения белков в способах, основанных на плоском слоевом электрофорезе, таких как ДИСК-электрофорез, ДДСН-ПААГ-электрофорез или ИЭФ. Это указывает на гидрофильный характер таких гелей, которые проявляют только слабые взаимодействия с биомолекулами. В КЭ возможно также покрытие кварцевой поверхности акриламидом.

Изготовление. В двухстадийной реакции стенка капилляра сначала обрабатывается гаммаметакрилоксипропилтриметоксисиланом в разбавленной уксусной кислоте.

Нанесенные таким способом виниловые группы на второй стадии реакции сополимеризуются в водном растворе с акриламидом. В качестве радикального инициатора реакции служит персульфат аммония, а катализатором является N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТМЭД) (рис. 66).

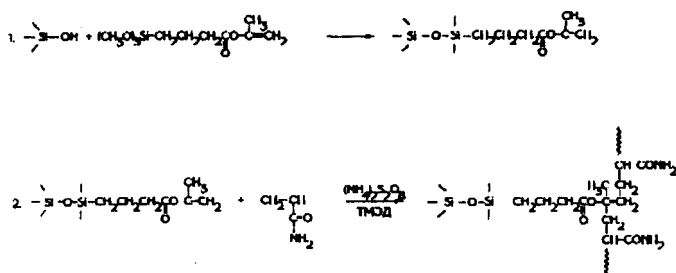


Рис.66. Схема, образования полиакриламидного покрытия.

Электроосмос и стабильность. ЭОП полностью подавляется при покрытии поверхности капилляра линейным полиакриламидом. Стабильность таких капилляров при низких рН (до 3) очень высокая, однако в щелочной среде при $pH > 8$ они нестабильны. Эта нестабильность проявляется в постепенном появлении ЭОП, а также колебаниях времени миграции проб.

Применимость. С учетом простоты производства, а также доступности приобретения покрытия на основе линейных полиакриламидов нашли широкое применение. В первую очередь речь идет не только о разделении белков, но и некоторых биомолекул - таких, как фрагменты ДНК.

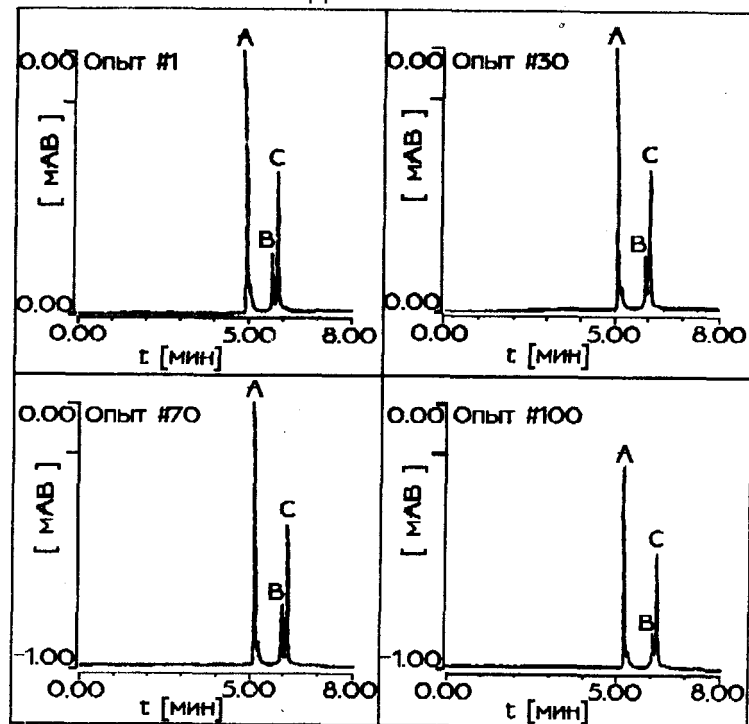
На рис. 67 показано разделение стандартных проб при рН 2.8. Несмотря на заметно возросший ЭОП, можно работать с нормальными полями, так что разделение

заканчивается примерно через 5 минут.

Вследствие того, что покрытия на основе линейных полиакриламидов позволяют полностью подавить ЭОП, можно перенести такой классический способ разделения, как ИЭФ, на КЭ.

В области биологически важных проб наряду с белками определенную роль играют также нуклеотиды, олигонуклеотиды и фрагменты ДНК. Такого рода пробы в КЭ до настоящего времени разделяли методом МЭХХ, а также полиакриламидгелевым КЭ. Покрытия на основе линейных полиакриламидов в сочетании с макромолекулярными буферными добавками можно привлечь для разделения фрагментов радикалов ДНК в широкой области.

Использование покрытых капилляров для этих целей представляется вполне выгодным, поскольку проблемы, связанные с использованием капилляров, заполненных гелем (образование пузырей, воспроизводимость и стабильность гелей) еще не решены. Наконец, капилляры, покрытые линейными полиакриламидами, можно использовать также для изготовления гельзаполненных капилляров.



химотрип-синоген.

Рис. 67. Разделение стандартных белков при проверке стабильности капилляра, покрытого полиакриламидом. Буфер: 30 мМ цитрат, pH 2.8; пробы: А- лизоцим, В - РНК, С -

9.3.2.2. Покрытия на основе поли(винилпирролидона)

Капилляры, покрытые поли(винилпирролидоном) (ПВП) успешно применяли для разделения белков методами гелепроникающей эксклюзионной хроматографии (ГПХ) и хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) в ВЭЖХ. Применению ПВП в качестве покрытия уделяется внимание также в КЭ.

Изготовление. На первой стадии на стенку капилляра наносится виниловое покрытие. На заключительной стадии проводят сополимеризацию с 1-винил-2-пирролидоном в водном растворе с использованием ТМЭД в качестве катализатора и персульфата аммония как радикального инициатора реакции.

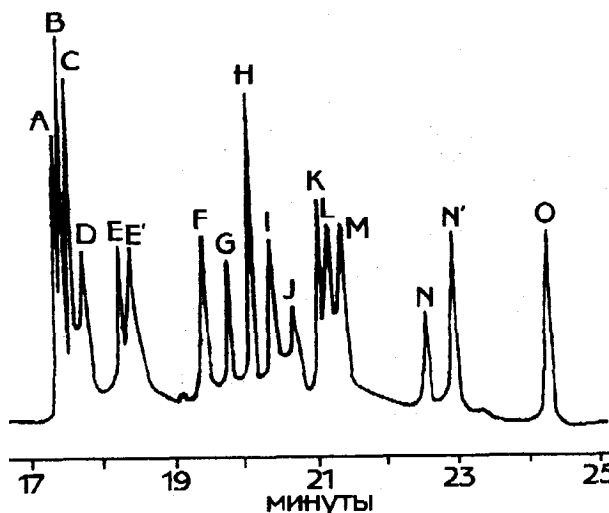


Рис. 68. Пример разделения белков в капилляре с ПВП-покрытием. Буфер: 58.5 мМ фосфат, pH 2.0; пробы: А - бэта-

лактоглобулин В, В - бета-лактоглобулин А, С - лизоцим, D - серумальбумин человека, E - РНК крупного рогатого скота, F - цитохром С, G - трипсиноген, H - миоглобин кита, I - трансферрин, J - кональбумин, K • миоглобин лошади, L - карбоксиангидраза В, M - карбоксиангидраза А, N - гемоглобин, O - парвальбумин.

Свойства и применимость. Оптимальная рабочая область для такого типа покрытий для разделения белков приходится на область сильных кислот, в которой капилляры сохраняют стабильность в течение нескольких недель. На рис. 68 показано разделение 15 (!) стандартных белков в области рН от 4.5 до 11 (!) и ММ от 12000 до 77000. Эффективность достигает 700000 теоретических тарелок в течение 25 минут. Покрытия на основе ПВП для кварцевых капилляров являются высокопроизводительными и при использовании в области, кислотных рН вполне конкурируют с покрытиями на основе линейных полиакриламидов.

9.3.2.3. Покрытие капилляров поли(этиленимином) (нанесение ионных слоев)

Поли(этиленимин) (ПЭИ) является положительно заряженным полимерным покрытием, которое закрепляется на стенке капилляра под действием электростатических взаимодействий.

Изготовление. Способ нанесения такого покрытия похож на способ нанесения покрытия из анионообменных материалов на полимерные и силикатные подложки для ВЭЖХ: при этом сначала на поверхности носителя адсорбируются первичные ПЭИ с различными ММ и концентрацией, затем производится их поперечное сшивание.

В качестве сшивающего агента служит в данном случае этиленгликольдиглицидилэфир. ПЭИ содержит sdвоенные полимерные цепи с первичными, вторичными и третичными аминогруппами в соотношении 1:2:1. Эти функциональные группы делают возможными как электростатические взаимодействия, так и поперечную сшивку.

Электроосмос. Вследствие того, что концентрация основных аминогрупп в полимере высока, в широкой области рН покрытие остается заряженным положительно, что приводит к обращению направления ЭОП. При этом абсолютные значения электроосмотических подвижностей, которые для данных покрытий достигаются при низших рН, лежат в той же области, что и скорости потоков для необработанных капилляров при основных рН (!). Подробная ЭОП/рН - характеристика, а также зависимость от количества нанесенного ПЭИ показана на рис. 69.

Как и ожидалось, с ростом значения рН буфера ЭОП увеличивается, т.к. при этом резко ускоряется депротонирование аминогрупп. Кроме того, в данном случае нельзя

также полностью исключить влияние силанольных поверхностных групп (депротонирование в щелочи!).

Применимость. Наряду с интересными свойствами по отношению к ЭОП, капилляры, покрытые ПЭИ, пригодны также для разделения белков. (Отталкивание положительно заряженных белков от стенки капилляра!). (Рис. 70).

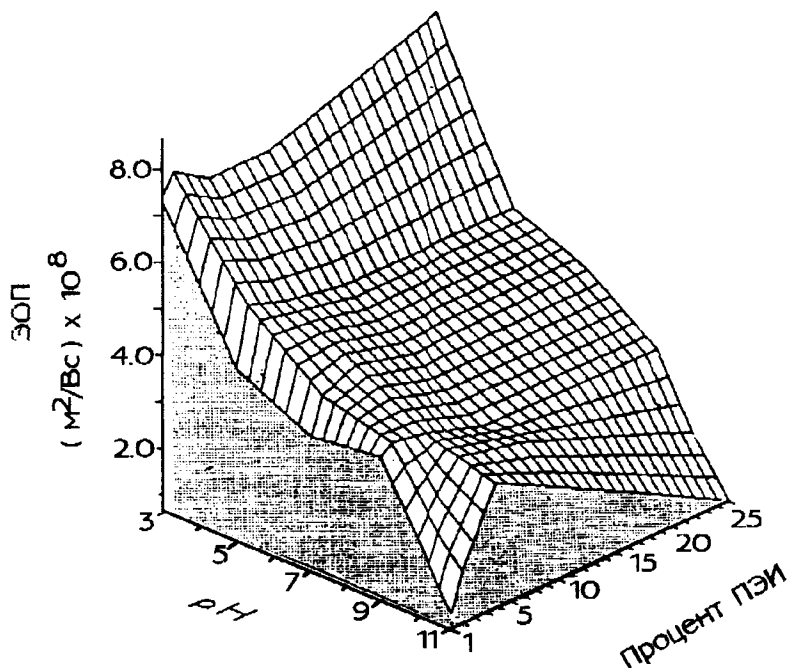


Рис. 69. Зависимость ЭОП от рН (ЭОП/рН-характеристики) капилляров с нанесенным ПЭИ при различных концентрациях ПЭИ.

9.3.2.4. Покрытие капилляров поли(метилглутаматом)

Исходным соединением для изготовления этого полипептидного покрытия является мономер М-карбоксиангидрид гаммаметилглутамата. Сначала проводят адсорбцию этого соединения на стенку капилляра, затем с помощью нагревания с одновременным расщеплением диоксида углерода проводят полимеризацию.

Электроосмос. Вследствие того, что нанесенный полимерный слой очень тонкий, ЭОП уменьшается незначительно и стенка капилляра экранируется не полностью.

Применимость. Капилляры с поли(метилглутаматовым) (ПМГ) покрытием пригодны для разделения белков. Кроме того, ими можно разделять комплексные смеси ферментов (рис 71).

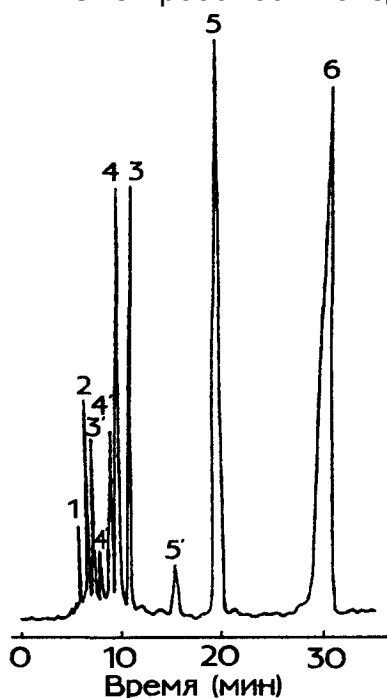


Рис.70. Разделение стандартных белков в капилляре, покрытом ПЭИ. Буфер: 20 мМ гидроксиламин/HCl, pH 7,0: пробы: 1 - мезицилоксид, 2 - миоглобин кита, 3 - БСА, 4 - хямотрипси-моген А крупного рогатого скота, 5 - цитохром С лошади, 6 - лизоцим.

9.3.2.5. Капилляры для ГХ и СКФХ с нанесенным полимером, используемые в КЭ.

Еще на начальной стадии развития в КЭ было предложено использовать капилляры с нанесенными полимерами, применяемые в ГХ. При этом преследовалась цель регулировать ЭОП в МЭКХ с помощью капилляров, покрытых полиметилсилоксаном (ПМС) или ПЭГ.

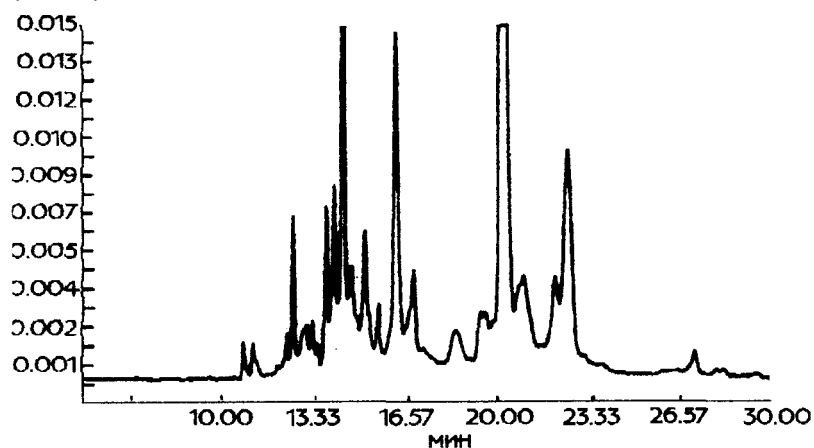


Рис. 71. Разделение целлюлозного комплекса ферментов в капилляре с ПМГ-покрытием. Буфер: 30 мМ фосфат, pH 7,0.

При использовании неполярного ПМС-покрытия в МЭКХ с ДДСН в качестве мицеллообразователя ЭОП возрастает по сравнению с использованием необработанного капилляра. Это приводит к более коротким временам анализа, но одновременно с этим и к меньшим площадям пиков. Увеличение электроосмоса можно объяснить адсорбцией молекул ПАВ на гидрофобной поверхности и, как следствие, повышением Δ -потенциала. В случае полиэтиленгликолевого покрытия наблюдается обратный эффект, т.е. меньшая скорость потока, большие времена анализа и большие площади пиков. Это значит, что такое покрытие экранирует поверхностные силанольные группы, однако, вследствие гидрофильного характера ПЭГ-цепочек, дополнительной адсорбции ДДСН не происходит. Областью применения таких капилляров является разделение фенолов и производных нитробензола, в частности,

производного пурина и циклических оснований.

9.4. Выводы

Применение кварцевых капилляров с покрытием для КЭ описаны в последние годы многими авторами. Однако до настоящего времени коммерчески доступны капилляры только с очень ограниченным числом типов покрытий:

1. Applied Biosystems (Foster City, California) предлагают катионные реагенты, которые дают положительно заряженные покрытия и, тем самым, приводят к обращению направления ЭОП. Этими покрытиями также заметно понижаются взаимодействия белков со стенками капилляров при значениях pH ниже их изоэлектрической точки.

2. BioRad (Hercules, California) предлагают капилляры, модифицированные гидрофильными покрытиями. Тем самым, как ЭОП, так и адсорбция биомолекул уменьшаются.

3. Supeico, Inc. (Bellefonte, Pennsylvania) предлагает различные связанные фазы. Тем самым, кроме уменьшения адсорбции белков должно обеспечиваться постоянство ЭОП в области pH от 3 до 10. Предлагаемыми к продаже фазами являются: нейтральные гидрофильные, слабо гидрофобные фазы C1, гидрофобные фазы C8 и сильно гидрофобные фазы C18.

4. Isco, Inc. (Lincoln, Nebraska) предлагает три фазы для покрытий: ковалентно связанную фазу C18 (белки), глицериновое покрытие (белки, пептиды) и сульфокислотное покрытие (нуклеотиды).

5. Коммерчески доступны также капилляры с различными полимерными покрытиями для применения в ГХ.

Тот факт, что в торговле других предложений нет, показывает, что многие покрытия не соответствуют требованиям рутинных аналитических измерений. Так, получаемые обычными способами слои на стенках капилляров являются прежде всего гидролитически нестабильными, тем более, что в КЭ многие разделения проходят в среде сильных оснований. Кроме того, экранирование активных адсорбционных центров на стенках капилляров является в большинстве случаев неполным, так что их применение для разделения белков достаточно условно.

Полимерные покрытия проявляют себя в последнем случае лучше, однако, как показывают опыты по разделению белков, и здесь при $pH > 9$ не обеспечивается гидролитическая стабильность.

Что касается разделения биомолекул, то ни одно из известных покрытий не позволяет одинаково хорошо разделять сильно различающиеся пробы (белков). Поэтому цель дальнейших исследований в этой области должна заключаться в получении более стабильных и универсальных покрытий.

В таблице 25 проведено сопоставление различных свойств модифицированных и немодифицированных капилляров.

Таблица 25.

Сравнение покрытых и непокрытых капилляров для применения в КЭ.

Непокрытые капилляры	Капилляры с покрытием
1. Катоднонаправленный электроосмос	1. Управление электроосмосом (направление, величина)
2. Проблемы с воспроизводимостью ЭОП (гистерезис при изменении pH)	2. Лучшая воспроизводимостью ЭОП (меньший гистерезис)
3. Сильная адсорбция биомолекул (необходима работа с добавками к буферам)	3. Пассивация стенки капилляра по отношению к молекулам пробы (уменьшение адсорбции на стенках)
4. Необходимо тщательное приготовление буфера	4. Проблемы с воспроизводимостью приготовления и долговременной стабильностью покрытий

10. Мицеллярная электрокинетическая хроматография

В КЗЭ нейтральные пробы достигают детектора вместе с катионами и анионами и не могут быть разделены. Метод МЭКХ, предложенный Терабе и др. в 1984 году, позволяет разделять незаряженные компоненты пробы за счет различной вероятности нахождения их в водной подвижной и псевдостационарной фазах. С помощью добавок детергентов к буферу при превышении ККМ образуются мицеллы. Эти мицеллы носят гидрофобный характер внутри и заряжены снаружи, чем и достигается электрофоретическая подвижность в электрическом поле. В зависимости от знака заряда эта электрофоретическая подвижность направлена в сторону катода или анода. МЭКХ может быть реализована в той же аппаратуре, что КЗЭ и требует лишь добавок детергента. Наиболее часто в качестве детергента применяют ДДСН. Получаемые мицеллы имеют отрицательный заряд и, как следствие, приобретают электрофоретическую подвижность в направлении анода. По аналогии с КЗЭ эффективная скорость перемещения компонентов пробы, так же, как и мицелл, представляет собой векторную сумму электрофоретической и электроосмотической скоростей. На рис. 71 представлена схема разделения посредством МЭКХ. Речь идет о наиболее часто встречающемся случае, когда анионный детергент растворен в нейтральном или щелочном буфере.

ЭОП направлен в сторону катода. Если вклад электрофоретической подвижности мицелл меньше вклада электроосмотической подвижности, то мицеллы движутся в сторону катода, т.е. в сторону детектора. Полярные молекулы, которые задерживаются только в водной фазе, движутся со скоростью электроосмотического потока и, спустя "мертвое" время, достигают детектора. Сильно гидрофобные молекулы пробы задерживаются прежде всего внутри мицелл и движутся со скоростью мицеллы. Следовательно, задержанные молекулы пробы появляются в детекторе в отрезок времени между t_0 и t_{mc} . Получаемое разделение нейтральных веществ основано на их различном распределении между буферным раствором и внутренней частью мицелл. Вследствие того, что молекулы пробы взаимодействуют с псевдостационарной фазой, точность метода МЭКХ соответствует точности обычного хроматографического метода.

Значение k' , по аналогии с хроматографией, можно определить как соотношение между числом молекул пробы в подвижной (n_{aq}) и стационарной (n_{mc}) фазах:

$$k' = (n_{mc}) / (n_{aq})$$

С учетом того, что стационарная фаза подвижна, для значения V' получим:

$$k' = (t_R - t_0) / \{t_0(1 - t_R/t_{mc})\}$$

В отличие от ВЭЖХ, в данном случае через детектор могут проходить также молекулы пробы с бесконечными значениями k' . В этом случае молекулы пробы задерживаются исключительно внутри мицелл. Влияние распределения ионов пробы между псевдостационарной фазой и буфером на разделение смеси веществ представлено на рис.73.

При постоянном Dk' расстояния между пиками с ростом значения k' уменьшаются. Для вычисления k' необходимо знать t_0 и t_{mc} . Однако для МЭКХ не существует идеального маркера. Маркер для t_0 должен быть электрически нейтральным и полностью свободным от мицелл. В качестве инертных маркеров подходят, например, ацетон; формамид или метанол, взаимодействием которых с мицеллами можно пренебречь и которые движутся со скоростью ЭОП. В дальнейшем эти вещества можно детектировать с помощью УФ-поглощения или изменения показателя преломления как пик показателя преломления.

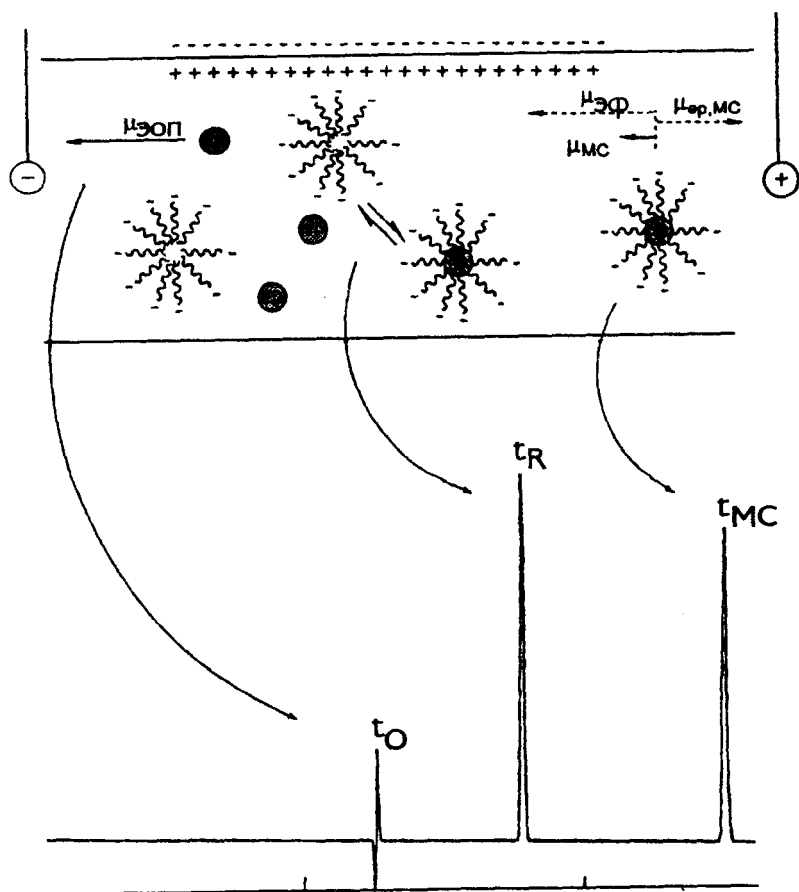


Рис. 72. Механизм разделения в МЭКХ

Труднее определить скорость движения мицелл. В качестве маркера для (мс находят применение такие водорастворимые соединения, которые задерживаются только внутри мицелл, например, судан III и судан IV.

Область применения метода МЭКХ не ограничивается только разделением нейтральных веществ, им можно разделять и заряженные пробы. Распределение веществ между водной и мицеллярной фазами может приводить к росту селективности и воздействовать тем самым на разделение ионов с очень схожими электрофоретическими подвижностями. В этих случаях разрешение пиков, достигаемое методом МЭКХ, перекрывает разрешение КЗЭ.

Для МЭКХ необходимы ионные детергенты. Многие детергенты можно приобрести в торговле, однако только немногие из них пригодны в качестве добавок в МЭКХ. Для того, чтобы детергент подходил к МЭКХ, он должен отвечать следующим требованиям:

- растворимость в соответствующем буфере должна быть достаточно высокой (> ККМ), чтобы могли образоваться мицеллы;
- мицеллярный раствор должен быть гомогенным и УФ-прозрачным;
- мицеллярный раствор должен обладать невысокой вязкостью.

В МЭКХ могут применяться как анионные, так и катионные детергенты. Однако наиболее распространены анионные детергенты. Наиболее часто применяется, как уже отмечалось, ДДСН. Меньше подходят гомологи ДДСН. Так, например, раствор децилсульфата натрия с необходимой концентрацией (50 мМ) обладает высокой электропроводностью, что увеличивает поток и, как следствие, возникают проблемы с джоулевым теплом. Тетрадецилсульфат натрия обладает при комнатных температурах слишком малой растворимостью, что ограничивает его применение только высокими температурами. В общем случае сульфаты и сульфонаты предпочтительнее карбоксилатов, поскольку они сохраняют постоянную часть заряда в широкой области pH. В таблице 26 приведены некоторые детергенты со своими КМК и числами агрегирования. Величина КМК представляет собой минимальную концентрацию детергента, необходимую для образования мицеллы. Под числом агрегирования понимают число молекул детергента, укладываемых по диаметру мицеллы.

Данные относятся к чистой воде. В буферном растворе значения КМК ниже, а числа агрегирования больше.

В качестве катионных детергентов в основном находят применение аммонийные соли с гидрофобными алкильными цепочками.

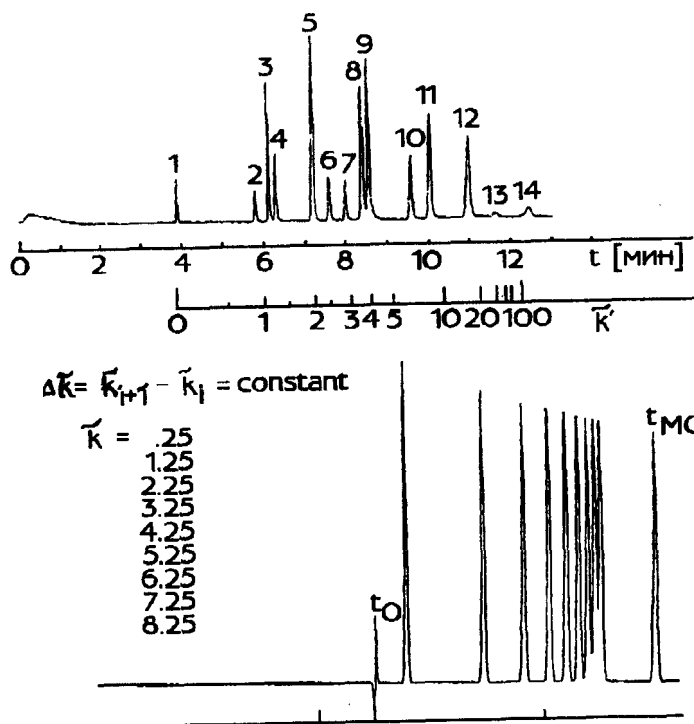


Рис. 73. А) Соотношение между временем миграции и значением k' . В) Разделение методом МЭХХ ароматических соединений: буфер: 110 мМ ДДСН в 25 мМ борате, рН 8.5: капилляр 75 мкм, 50/70 см; напряжение 20 кВ, детектирование 200 нм; 1 - формамид (to), 2 - анилин, 3 - фенол, 4 - бензиловый спирт, 5 - бензойная кислота, 6 - бензальдегид, 7 - нитробензол, 8 - фенилацетон, бензилцианид, 9 - ацетофенон, 10 - толуол, 11 - хлорбензол, 12 - этилбензол+о-ксилол, 13 - нафталин, 14 - суданIII (1мс).

Таблица 26

ККМ и числа агрегирования (n_{agr}) некоторых детергентов.

Детергент	ККМ (мМ)	N_{agr}
Децилсульфат натрия	33	41
Додецилсульфат натрия	8.2	64
Тетрадецилсульфат натрия	2.05	80
Гексадецилсульфат натрия	0.45	100
Лаурилметилсульфат натрия	8.7	-
Хелат натрия	13	-
Дегидрохелат натрия	10	-
Таурохелат натрия	10	-
Тауродегидрохелат натрия	6	-
Децилтриметиламмонийбромид	65	-
Додецилтриметиламмонийбромид	15	50
Тетрадецилтриметиламмонийбромид	3.5	75
Гексадецилтриметиламмонийбромид	0.92	61

Адсорбция молекул детергента на стенках капилляра приводит к обращению направления ЭОП уже при концентрациях несколько ниже ККМ. Вследствие этого анализируемые вещества движутся к аноду. Электрическое поле в данном случае должно налагаться таким образом, чтобы анод находился со стороны детектора. Противоион ионного детергента при данной температуре оказывает определенное влияние на ККМ. Например, ДДСН более растворим в воде, чем додецилсульфат калия. Если в буфере присутствуют ионы калия, это может привести к обмену противоионов, в результате чего растворимость детергента может уменьшиться настолько, что ККМ не будет достигаться.

Разрешающая способность в методе МЭХХ определяется аналогично хроматографическому методу:

$$R_s = \frac{\Delta t_M}{(w_1 + w_2) / 2} = \frac{\Delta t_M}{w}$$

С учетом подвижности мицелл получим соотношение для разрешающей

способности:

$$R_s = (\sqrt{N/4}) \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot k'_2 / (1 + k'_2) \cdot \frac{1 - t_O / t_{MC}}{1 + k'_1 t_O / t_{MC}}$$

Уравнение описывает зависимость разрешающей способности от факторов N, α , k' , t_O/t_{MC} . Разрешение растет пропорционально квадратному корню из числа тарелок. Чем больше наложенная разность потенциалов, тем число теоретических тарелок больше до тех пор, пока с увеличением переноса вещества в потоке джоулево тепло вырастет не слишком сильно. Среднее число теоретических тарелок для большинства веществ пробы лежит в пределах от 100 до 200 тысяч. Если эффективность заметно ниже, то это означает, что молекулы пробы адсорбируются на стенках капилляра. В этом случае капилляр следует промыть и условия опыта оптимизировать, например, с помощью изменения pH.

Гидрофобные вещества пробы или анализируемые вещества с большими временами миграции дают, как правило, большее число теоретических тарелок вследствие того, что коэффициент диффузии мицелл меньше, чем для анализируемых веществ в буфере. Число теоретических тарелок несущественно зависит от длины капилляра, однако все же при использовании коротких капилляров вводимый объем должен уменьшаться для того, чтобы избежать уширения пиков, вызванного перегрузкой объема.

Селективность α - важнейший фактор, т.к. за счет селективности можно достичь большого улучшения разрешающей способности. Селективность определяется коэффициентами распределения между подвижной и стационарной фазами и, следовательно, зависит от химических свойств разделяемой системы. На разрешающую способность можно воздействовать как изменением состава буфера, так и выбором другого детергента. Методом МЭКХ без труда можно разделить два вещества пробы, обладающие селективностью 1.02. С ростом величины k' разрешающая способность, обусловленная подвижностью стационарной фазы, растет не постоянно, а проходит через максимум. Эта характерная для МЭКХ зависимость представлена на рис. 74. При постоянной селективности расстояния между максимумами пиков уменьшаются для маленьких и больших значений k' . С помощью расчетов можно показать, что оптимальное значение k' составляет $(t_{MC}/t_O)^{1/2}$.

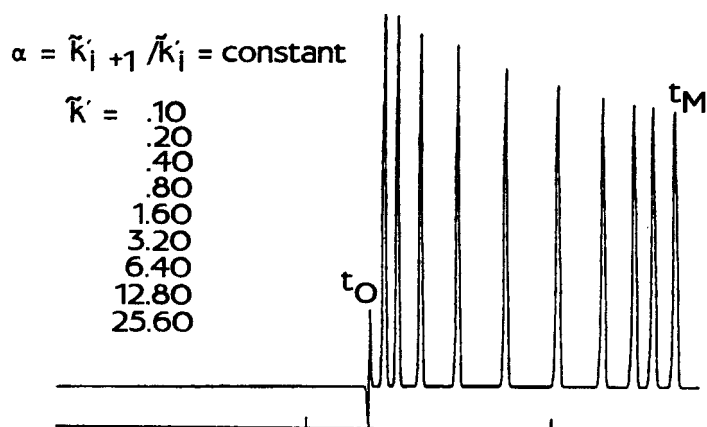


Рис. 74. Зависимость между селективностью и значением k' .

Как и в хроматографии, в МЭКХ значение k' зависит от коэффициента распределения через соотношение фаз'

$$k' = KV_{MC}/V_{aq}$$

k - коэффициент распределения, V_{MC} - объем мицеллы, V_{aq} - оставшийся объем буфера и U_{MC}/a_q - представляет собой соотношение фаз. В отличие от хроматографии, соотношение фаз в методе МЭКХ зависит от объема мицелл и, тем самым, от концентрации детергента. Зависимость между k' и концентрацией детергента линейна. Таким образом, если известна величина ККМ, величиной k' можно управлять с помощью концентрации детергента. В большинстве случаев во избежание слишком

больших потоков концентрация детергента лежит в интервале между 20 и 200 мМ.

Линейная зависимость между k' и концентрацией детергента при разделении ароматических соединений показана на рис. 75.

Влияние соотношения фаз на разрешение показано на рис. 76. Рост соотношения фаз приводит сначала к улучшению разрешающей способности, которая однако при дальнейшем увеличении соотношения фаз ухудшается. В представленных хроматограммах речь идет о расчетных величинах, которые делают этот эффект более наглядным. Вследствие того, что повышение концентрации детергента влияет также на ЭОП, вязкость и ионную силу буфера, на практике хроматограммы выглядят иначе.

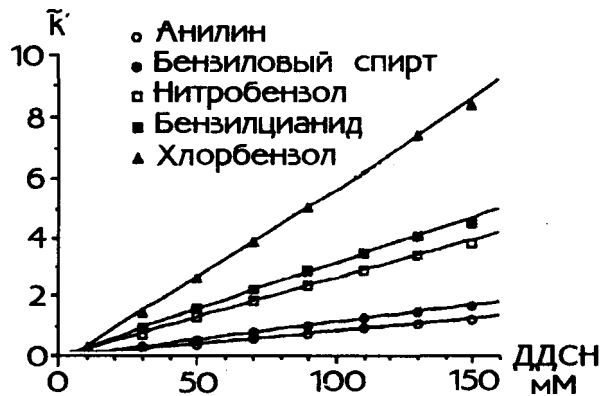


Рис. 75. Линейная зависимость между k' и концентрацией детергента. Капилляр 75 мкм, 50/57 см, буфер ДДСН в 50 мМ борате, pH 8.5, напряжение 20 кВ.

Интервал времен миграции молекул пробы дается величинами t_0 и $t_{мс}$. Чем меньше отношение времен миграции $t_0/t_{мс}$, тем больше интервал времен миграции и, тем самым, разрешение. Влияние ЭОП на интервал времен элюирования показан на рис. 77. Уменьшение ЭОП приводит к росту интервала времен элюирования и, тем самым, к

росту разрешения пиков. Недостатком, однако, является то, что при уменьшении ЭОП резко возрастает время анализа. На практике уменьшение ЭОП достигается добавлением некоторых органических растворителей, например, метанола или изопропанола (< 20%). Другая возможность уменьшения ЭОП состоит в снижении pH буфера.

Изменение поверхности капилляра, например при нанесении покрытия, представляет собой еще одну возможность влияния на ЭОП. Некоторые добавки, такие как производные метилцеллюлозы или этиленгликоль, применяются в КЭ для увеличения вязкости буфера. Увеличение вязкости приводит не только к уменьшению ЭОП, но влияет в одинаковой степени и на электрофоретическую подвижность. Следовательно, увеличением вязкости невозможно улучшить разрешающую способность.

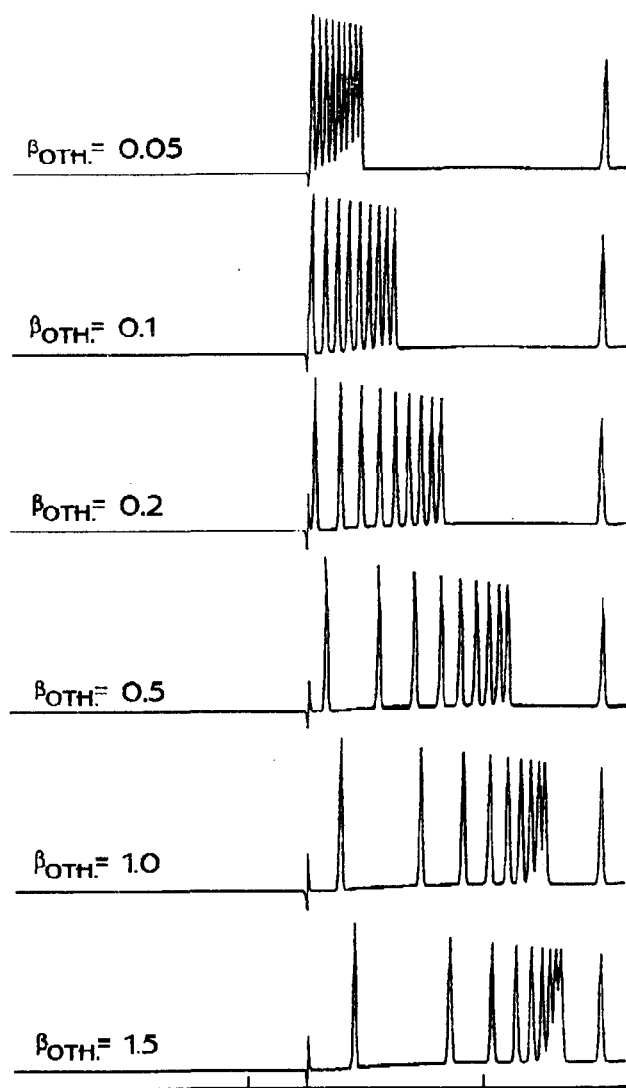


Рис. 76. Влияние соотношения фаз на разрешение пиков.

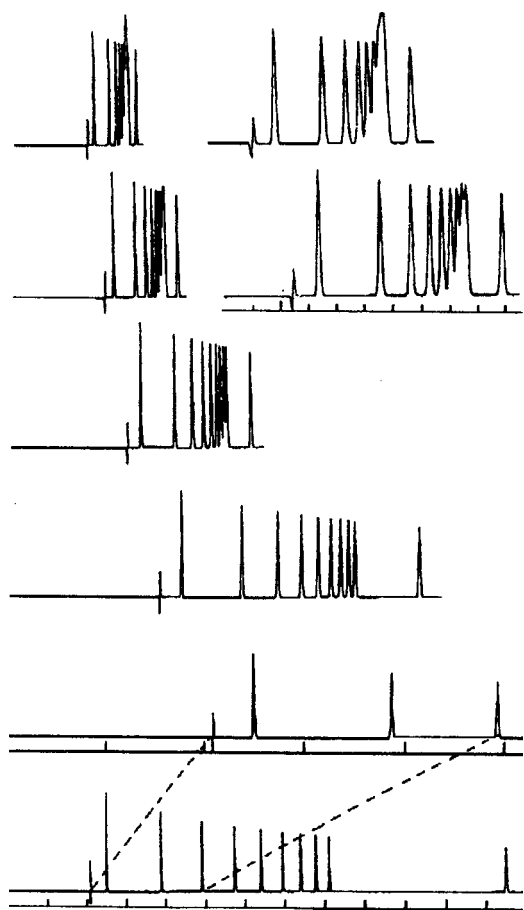


Рис. 77. Влияние ЭОП на разделение.

Увеличение электрофоретической подвижности также может приводить к увеличению интервала времен миграции. Однако этот метод не имеет большого практического значения, т.к. выбором другого детергента можно влиять на селективность. Небольшие изменения селективности могут, особенно при малых α , вызвать большие изменения разрешающей способности. Это, в свою очередь, может свести к нулю и даже обратить эффект повышения разрешения за счет увеличения электрофоретической подвижности мицелл.

Ниже более подробно будут рассмотрены факторы, влияющие на селективность. Рост температуры приводит к уменьшению времени миграции, поскольку как коэффициент распределения, так и вязкость при этом уменьшаются. Вследствие того, что температурные зависимости коэффициентов распределения для каждого компонента пробы различаются, селективность изменяется. Несмотря на то, что изменение температуры не очень сильно влияет на селективность, для воспроизводимости анализов и из-за колебаний времени миграции температура должна поддерживаться постоянной. Условий разделения, вызывающих большие потоки, следует избегать, поскольку большие потоки приводят к нагреванию буфера и капилляра. Поэтому выгодно эффективно охлаждать капилляр.

Молекула детергента состоит из гидрофильной и гидрофобной частей. Вследствие того, что молекулы пробы взаимодействуют с поверхностью мицеллы, гидрофильная группировка (ионная часть) оказывает большее влияние на селективность мицелл. Так, например, ДДСН и тетрадецилсульфат натрия имеют аналогичные свойства, в то время как селективность при переходе от ДДСН к натрий-М-лаурил-М-метилтаурату (НЛМТ) резко изменяется. Предположительно здесь речь идет о полярных веществах пробы. Изменения селективности могут быть легко достигнуты добавками других детергентов. Несмотря на то, что МЭКХ обычно применяется для разделения нейтральных соединений, этим методом можно разделять также ионные соединения. В случае ионных соединений МЭКХ в основном применяют там, где разделение не может быть проведено методом КЗЭ. Так как мицеллы заряжены снаружи, на молекулы пробы с тем же знаком заряда, что и мицеллы, будут действовать более сильные силы

отталкивания, чем на молекулы пробы с противоположным зарядом. Следовательно, в случае ионных молекул пробы гидрофобность и эффекты заряженности оказывают влияние на коэффициент распределения.

Изменение селективности можно вызвать не только полной заменой детергента, но и модифицированием мицелл. При добавлении второго детергента образуется смешанная мицелла. Мицелла, состоящая из одного ионного и одного неионного детергента, имеет меньший эффективный заряд и больше по размерам. Тем самым оказывается влияние не только на коэффициент распределения – смешанная мицелла имеет меньшую подвижность, чем мицелла, состоящая только из ионного детергента.

Добавление нейтральных веществ к водной фазе также является очень эффективным средством влияния на селективность. Добавки циклодекстринов (ЦД) повышают вероятность нахождения вещества пробы в подвижной фазе, поскольку молекулы пробы могут диффундировать в полости ЦД. Если добавлять к подвижной фазе вещества-образователи ионных пар, можно очень сильно влиять на селективность, особенно по ионным соединениям. Если, например, к раствору ДДСН добавить тетраалкиламмонийную соль, вследствие образования ионных пар увеличивается время миграции анионных молекул пробы. Кроме того, уменьшается электростатическое отталкивание от мицелл. Напротив, времена миграции катионных компонентов пробы уменьшаются, т.к. образователь ионных пар проявляет себя как конкурент во взаимодействии с мицеллами. Высокие концентрации мочевины могут увеличить растворимость гидрофобных веществ пробы в воде.

В МЭХ можно добавлением мочевины влиять на коэффициент распределения и, как следствие, на селективность. Аналогичные эффекты можно получить добавлением органических модификаторов к водной фазе. Речь идет об органических растворителях, смешиваемых с соответствующим буфером. Однако добавками модификаторов можно влиять не только на полярность подвижной фазы. Это приводит также к изменениям ЭОП и свойств мицелл. Влияние органических модификаторов в МЭХ представлено на рис. 78.

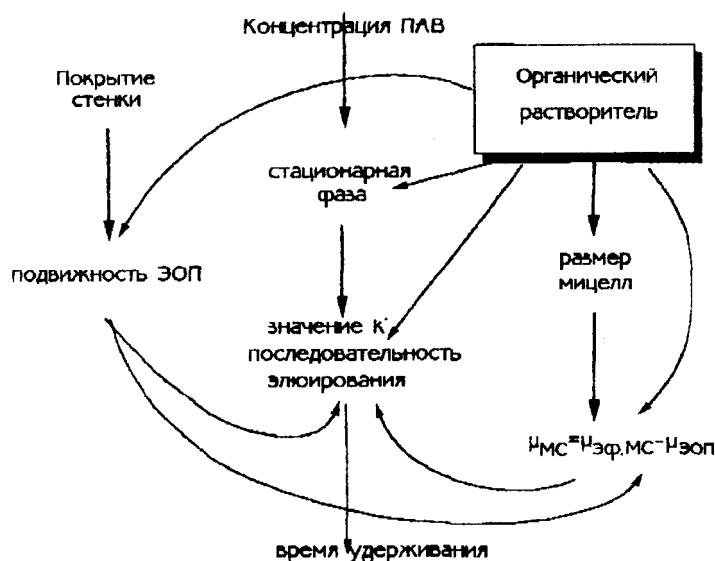


Рис. 78. Влияние органических модификаторов в МЭХ.

Селективность можно также улучшить добавлением солей и образованием, тем самым, комплексных соединений.

На примере разделения смеси производных аминокислот - флуоренилметилоксикарбониллов (ФМОК) можно показать возможности оптимизирования в методе МЭХ. На рис. 79 показано разделение 11 ФМОК-аминокислот.

Из-за относительно большого и одинакового для всех проб вклада нейтральных производных электрофоретическая подвижность производных очень схожа и поэтому их полное разделение вряд ли возможно.

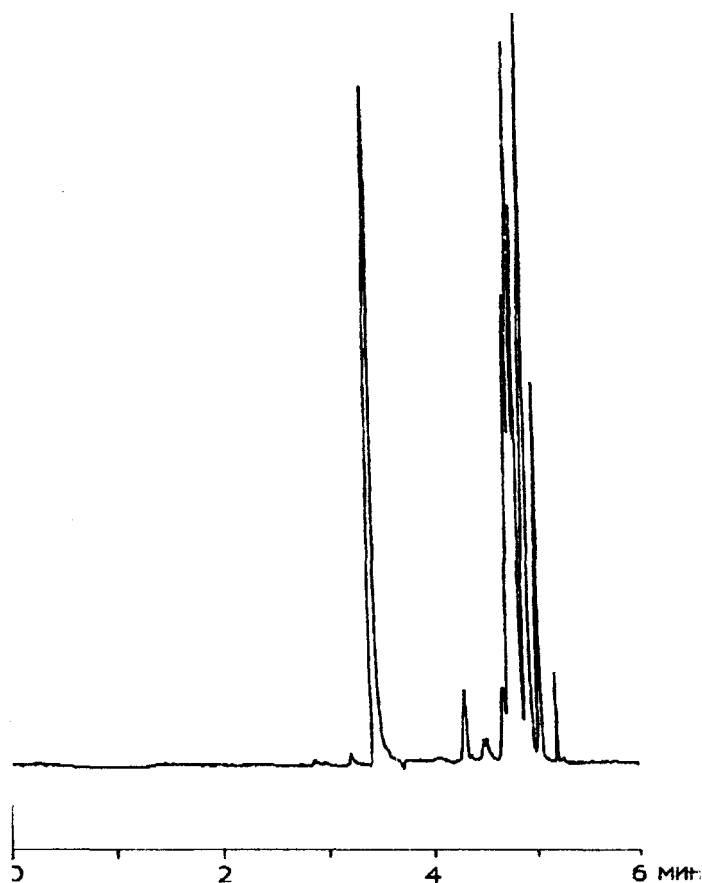


Рис. 79. Разделение смеси 11 ФМОК-аминокислот методом КЗЭ. Капилляр: 50мкм x 50/75 см, буфер: бора $\pm$ 50 мМ, рН 9.5: УФ-детектирование 200 нм; поле 330 В/см.

Добавлением ДДСН к буферу при прочих равных условиях, как показано на рис. 80, достигается лучшее разделение.

Добавлением органических компонентов к буферу можно еще лучше оптимизировать разделение. На рис. 81 показано разделение проб при идентичных условиях за исключением того, что в данном случае к буферу добавлен метанол. Эта добавка влияет на равновесное распределение пробы между буфером и мицеллой, при этом изменяется также ЭОП и растворимость пробы в буфере.

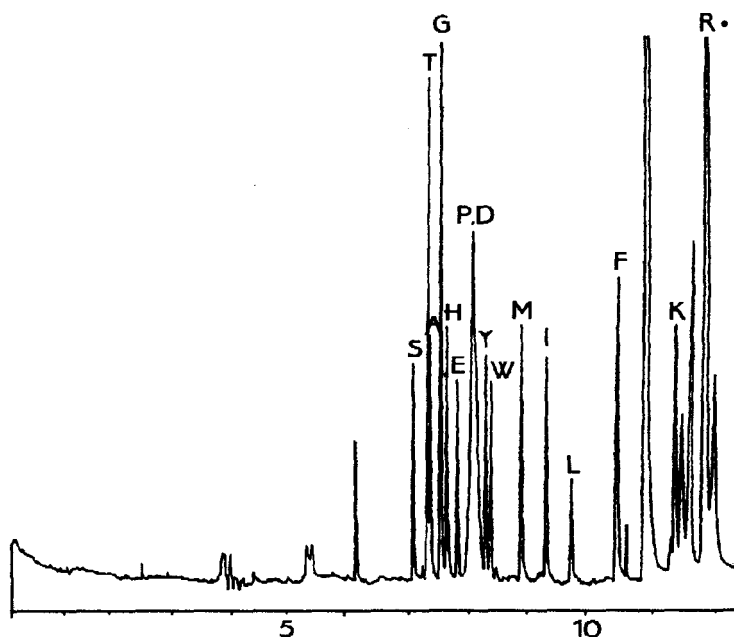


Рис. 80. Разделение 16 ФМОК-аминокислот методом МЭКХ. Идентификация пиков - в буквенном коде для аминокислот. Буфер: 50 мМ борат, 50мМДДСН, рН 9.5.

Принцип разделения МЭКХ может применяться также в хроматографическом методе с обращением фаз. В качестве примера на рис. 82 показано разделение смеси компонентов взрывчатых веществ, в состав которых обычно входят незаряженные производные нитробензола.

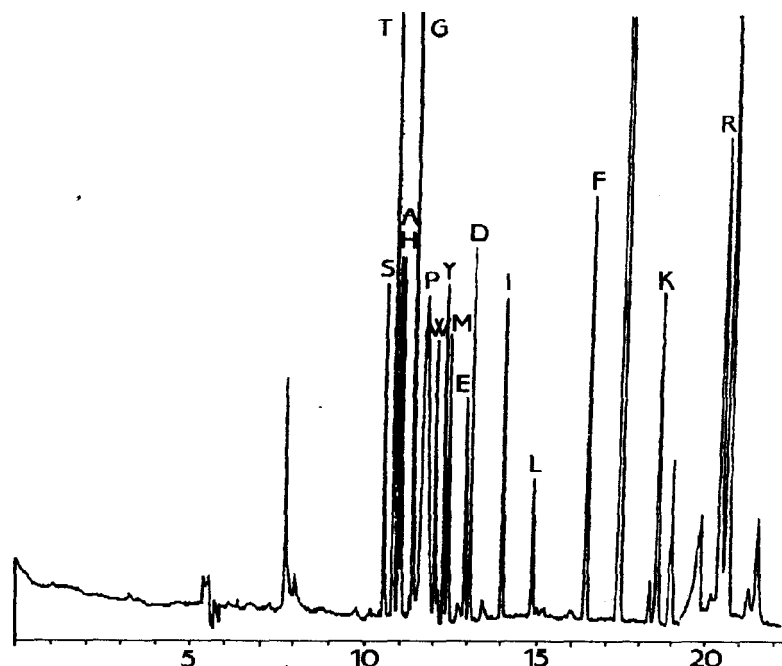


Рис. 81. Разделение 16 ФМОК-аминокислот методом МЭКХ с добавлением метанола к буферу. Буфер: 50мМ борат, 50мМ ДДСН, pH 9.5, об. 10% метанола.

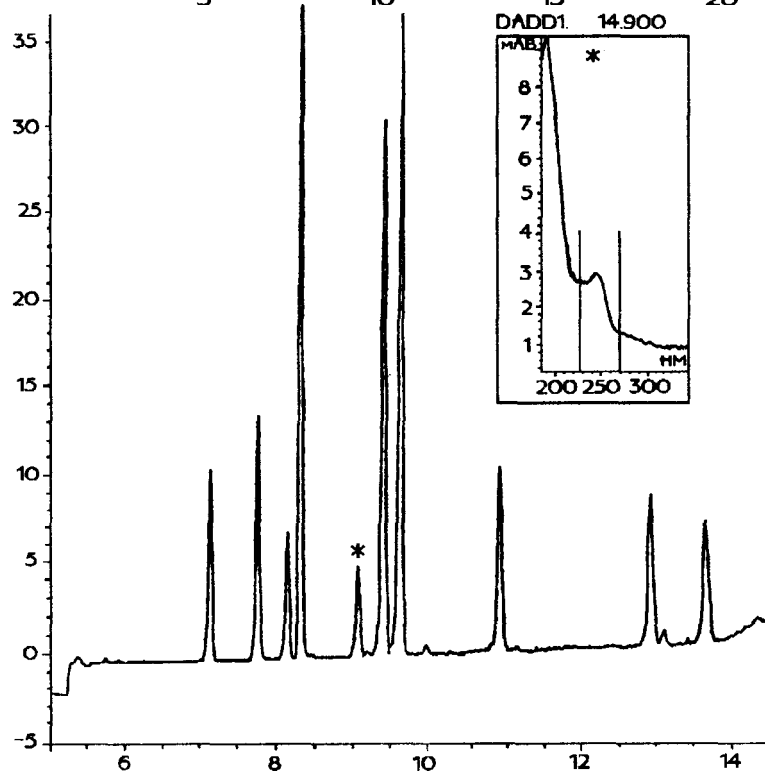


Рис. 82. Разделение компонентов взрывчатых веществ (ароматических нитросоединений). Условия - прибор КЭ типа НР 3D СЕ; капилляр: 50 мкм, 47/55 см, поле: 363 В/см; буфер: 2.5 мМ борат, 50 мМ ДДСН, pH 8.7; ввод пробы - электрокинетический 5 кВ, 2 с; детектирование: ячейка детектора 150 мкм, 250±20 им; проба: 2-амино-6-нитротолуол, 2-амино-2,6-нитротолуол, 2-нитротолуол, 3-нитротолуол, 4-нитротолуол, 1,3-динитробензол, 1,2-динитробензол, 2,6-динитротолуол, 2,4-динитротолуол, нитробензол, 2,4,6-тринитротолуол.

11. Разделение энантиомеров

Разделение энантиомеров представляет собой одну из важнейших областей аналитической химии. Хотя энантиомеры и относятся друг к другу как изображение и его зеркальное отражение и не различаются по своим физико-химическим свойствам, один из энантиомеров вращает поляризованный свет направо, в то время как его зеркальное отражение - налево (т.е. они проявляют оптическую активность). Смесь эквимольных количеств пары энантиомеров не проявляет оптической активности, поскольку направления вращения света противоположны.

Если смесь энантиомеров, которую необходимо разделить, добавить к оптически активной среде, состоящей из чистого энантиомера, то в разделяющей системе поведение анализируемых веществ будет очень различным, что позволяет осуществить их разделение. Различное поведение можно объяснить тем, что в оптически активной среде с оптически активным окружением взаимодействует только один из энантиомеров, в то время как его зеркальное отражение не взаимодействует. Если различие во взаимодействиях достаточно велико, смесь энантиомеров разделяется на чистые компоненты.

Поэтому при разделении энантиомеров основное внимание следует уделять выбору подходящей оптически активной среды - так называемого хирального селектора (см. таблицу 27). Поскольку универсальных хиральных селекторов не существует и проблемы разделения каждый раз необходимо оптимизировать по-новому, основная задача разделения энантиомеров заключается в выборе подходящего селектора.

В КЭ оптически активная среда обычно создается добавками оптически активных веществ к разделяющему буферу. Этот простой способ обладает большим преимуществом, поскольку в этом случае отпадает необходимость в длительных и требующих интенсивной работы стадиях иммобилизации хиральных селекторов на различных носителях. Поиск хирального селектора происходит, как и в ВЭЖХ, методом "проб и ошибок". Основным недостатком КЭ в разделении энантиомеров является чисто аналитическая направленность. Для решения препаративных задач метод малоприменим.



Рис. 83. Схемы замещения на центре хиральности. А, В, X, Y: различные замещения на одном центре хиральности (асимметричный атом углерода).

Таблица 27

Хиральные селекторы, применяемые в настоящее время в КЭ

Классы селекторов	Хиральные селекторы	Проблемы
ЦД	а-, b-, g-ЦД, метилированные ЦД Гидроксипропилированные ЦД Карбоксиметилированные ЦД Карбоксиэтилированные ЦД Суцилинированные ЦД Фосфатированные ЦД Сульфобутилэфирные ЦД	Добавляются преимущественно к ароматическим или частично гидрофобным пробам
Хиральный мицеллообразователь (часто добавляется вместе с ДДСН в	ДДСН- дигитонин ДДСН-SDVal ДДСН-SDA1a Тауродезоксихолат Дезоксихолат	До настоящего времени имеет ограниченное применение
Хиральные металлические комплексы	Медно-Ь-гистидиновые комплексы Медно-аспартамовые комплексы	До настоящего времени применяли только для дансиламинокислот; флуоресцентное детектирование
Хиральный эфир краун-	18-краун-Ь-тетракарбоксиловые кислоты	Высокая цена, имеет ограниченное применение

Чистые энантиомеры	L-винная кислота	До настоящего времени использовалась только для разделения хиральных комплексов
Белки и глобулы	Альбумин, полученный из крупного рогатого скота	Проблемы с детектированием, связанные с собственной адсорбцией

11.2. Смешанные химические разделяющие системы

Вышеназванные хиральные селекторы часто применяются не сами по себе, а вместе с другими буферными добавками. Используются в основном такие мицеллообразователи, как ДДСН, который наряду с хиральным селектором образует вторую разделяющую систему. Ниже приводится краткий анализ некоторых таких комбинаций.

1) ДДСН-ЦД. Из смешанных методов этот вариант наиболее распространен. Мицеллярная система в данном случае отвечает за разделение отдельных компонентов пробы, а ЦД в качестве хирального селектора - за разделение компонентов пробы в чистых энантиомерах. Однако, при применении детергентов вместе с ЦД часто наблюдается их отрицательное влияние. Детергенты с длинными алкановыми цепочками могут внедряться внутрь ЦД-колец и препятствовать воздействию хирального селектора.

2) Добавка второго хирального селектора. В этом методе в буферной системе находятся два различных хиральных селектора. Однако этот способ до настоящего времени только в отдельных случаях приводил к улучшению разрешения при разделении энантиомеров. Например, комбинация хирального краун-эфира с ЦД для некоторых проб проявляет синергический эффект. Иногда к улучшению селективности приводит также использование двух различных ЦД в одной буферной системе. Однако, в общем случае введение второго селектора и, таким образом, второй равновесной системы в буфер приводит к потере селективности.

3) Смешанные мицеллообразующие системы. Использование чистых хиральных детергентов в качестве мицеллообразователей во многих случаях приводит к плохому разрешению из-за несимметричности пиков и плохой эффективности. Добавление ДДСН как добавочного мицеллообразователя в некоторых случаях разделения приводило к улучшению формы пика и, тем самым, к лучшему разрешению. Смешанные мицеллы, образующиеся при добавлении ДДСН, сами ускоряют обменные процессы в мицеллах и уменьшают взаимодействия с хиральным селектором (эффект разбавления).

Поскольку в настоящее время ЦД и их производные обладают наиболее широким спектром применения в качестве хиральных селекторов, а также наибольшими перспективами в КЭ, остановимся на них более подробно.

Реакции, в результате которых получают производные ЦД, позволяют проводить синтез множества новых хиральных селекторов с существенно разным воздействием на хиральные различия между селектором и анализируемым веществом. В общем случае за хиральные отличительные свойства отвечают гидрофобные и ионные взаимодействия, а также стерические эффекты и образование мостиковых водородных связей.

Было показано, что при разделении энантиомеров важную роль наряду с выбором подходящего хирального селектора играют и другие параметры электрофоретической системы, которые требуют дальнейшей оптимизации. Например, на процесс оптимизации разделения энантиомеров решающее влияние оказывает величина pH. Вследствие того, что разделение энантиомеров методом КЭ основано на различии в подвижностях между D- и L-формами, анализируемые вещества необходимо перевести в ионную форму, что обеспечивается подходящим значением pH. При электрофоретическом движении анализируемых веществ через "квазистационарную" фазу (в данном случае - ЦД) происходит разделение пары энантиомеров. Важнейшими оптимизирующими параметрами в данном случае являются концентрация хирального селектора в используемой буферной системе, сама буферная система (вид фонового электролита), а также другие буферные добавки, такие как ДДСН, метанол и др. Их

действие на разделение энантиомеров будет рассмотрено ниже.

11.3. Капилляры с ЭОП и без него

Как правило, проблемой в разделении энантиомеров является невысокая селективность и, вследствие этого, длительные времена анализов, даже в случае, когда найдем подходящий хиральный селектор для разделения. Причиной этого являются небольшие различия в подвижностях D- и L-форм анализируемых веществ, а также наличие сильного ЭОП, который перекрывает эффект разделения в немодифицированных капиллярах. Небольшие различия в подвижностях приводят к разделению только в тех случаях, когда эффективные участки движения максимальны. Это означает, что анализируемое вещество в электрическом поле должно двигаться от точки ввода до детектора самостоятельно. Наличие ЭОП в данном случае мешает разрешению. Для достижения максимального разрешения по возможности за короткое время покрытые (модифицированные) капилляры используются при сильно заторможенном ЭОП. При этом можно использовать очень короткие капилляры (7-20 см) и сильные электрические поля (до 1000 В/см). При использовании подходящего хирального селектора это приводит к очень малым временам анализа при высоком разрешении. Различие между немодифицированным и покрытым капилляром продемонстрировано на рис. 84.

Заметно более высокая эффективность для непокрытого капилляра основана на том, что ЭОП перекрывает подвижность анализируемых веществ, и они очень быстро проходят через детектор. Здесь ясно видно, что более высокая производительность за более короткое время при разделении достигается при применении покрытого капилляра. Использование покрытого капилляра в выборе подходящего хирального селектора играет большую роль, так как в данном случае можно много быстрее определить применимость данного селектора, т.е. его селективность.

11.4. Выбор подходящего LLQ

При использовании ЦД в качестве хиральных селекторов решающее влияние на селективность оказывает не только тип ЦД, но и тип заместителя в производных ЦД. Растворимость ЦД в воде также может резко увеличиться при применении производных. Это показано для тестовой смеси различных типов ЦД и их производных на рис. 85.

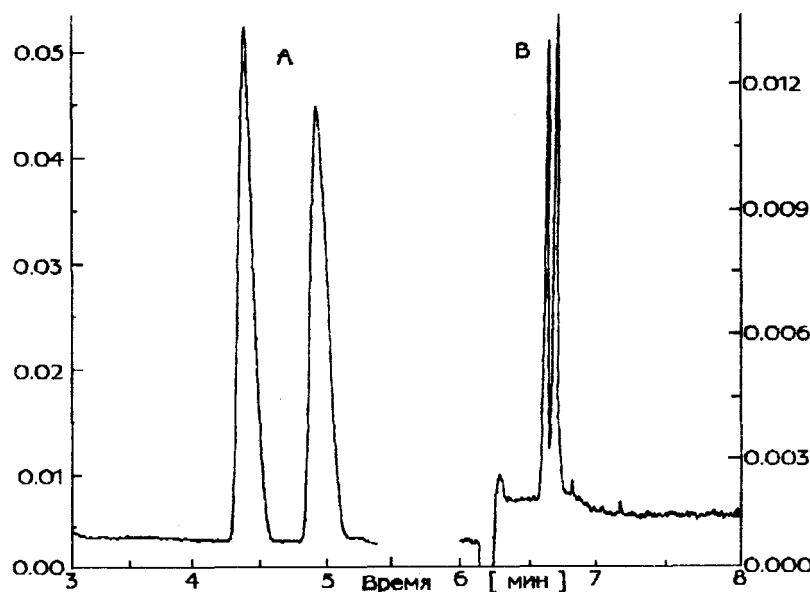


Рис. 84. Разделение энантиомеров гексабарбитала в капилляре с покрытием (A) и без покрытия (B). Условия разделения: 0.1 М ТЭЕ, pH 8.3, детектирование при 214 нм; ввод пробы: 1 с, 2 кВ, об. 1.56% р-ЦД, $t=25^{\circ}\text{C}$. А) Покрытие капилляра: 4% линейный полиакриламид, $E=710$ В/см (выход заземлен), $L=7/27$ см. В) Капилляр без покрытия, $E=400$ В/см. $b=50/57$ см.

11.5. Оптимизация концентрации ЦД

Следующая важная составная часть оптимизации состоит в установлении подходящей концентрации ЦД. В зависимости от типа анализируемых веществ с ростом концентрации ЦД могут наблюдаться улучшение разрешения, потеря или даже инверсия разрешения. Это может приводить к неправильным выводам о различных

механизмах разделения энантиомеров с помощью ЦД. На рис. 86 показано влияние концентрации ЦД на разделение энантиомеров.

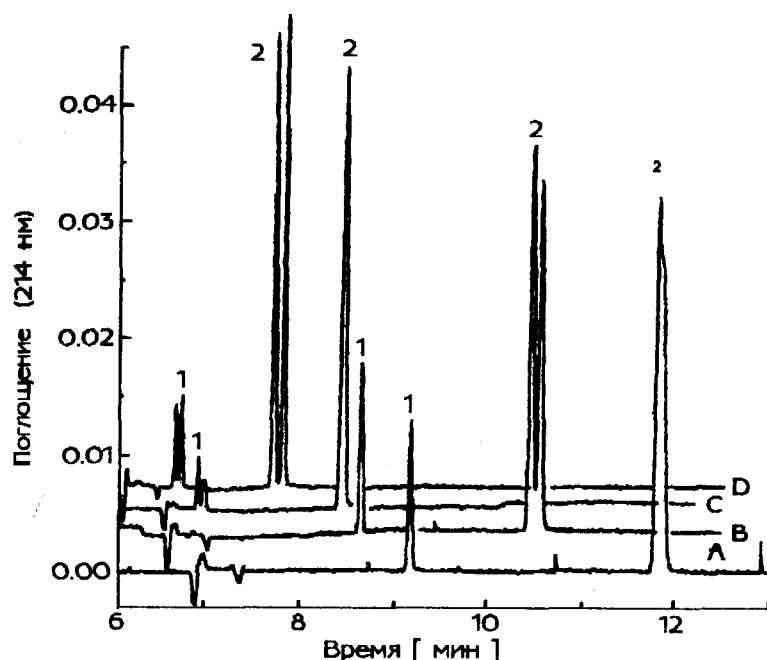


Рис. 85. Разделительный потенциал различных типов ЦД. Условия разделения: $L=50/57$ см, $E=350$ В/см, буфер: 0.1 М ТВЕ, pH 8.3; детектирование при 214 нм, об. 1.5% ЦД; пробы: 1 - d,1-гексабарбитал, 2 - (l,1-дансил-фенидаланин; А) α -ЦД, В) гидроксипропил - α -ЦД, С) метил - β -ЦД, D) гидроксипропил- β -ЦД.

В немодифицированной с помощью ЦД буферной системе отрицательно заряженные энантиомеры обладают высокой подвижностью относительно ЭОП, так как они без сопротивления могут проходить сквозь буфер (нижняя электрофореграмма).. Уже небольшие добавки хирального селектора вызывают сильное уменьшение подвижности анализируемых веществ, причем в этом случае наблюдается вполне Достаточная селективность. Разделение при очень низких концентрациях ЦД объясняется различным временем пребывания D- и L-форм в ЦД. Энантиомер с большим временем пребывания в ЦД проявляет меньшую подвижность и детектируется ближе к ЭОП.

Дальнейший рост концентрации хирального селектора может резко ограничить подвижность анализируемых веществ, так что они ; Детектируются очень близко к ЭОП. В этом случае из-за слишком малой зоны движения разделение энантиомеров может стать невозможным. Кроме того, при повышении концентрации ЦД растет вязкость буфера, что замедляет ЭОП и увеличивает время анализов. В капиллярах с заторможенным ЭОП рост концентрации ЦД также приводит к уменьшению подвижности анализируемых веществ, повышению вязкости буферной системы и, вследствие этого, к увеличению времени анализов.

Наряду с уменьшением разрешения вследствие небольшого времени пребывания в капилляре при высоких концентрациях ЦД могут наблюдаться также и другие эффекты. В некоторых случаях оказывается, что уже при очень низких концентрациях ЦД наблюдается хорошее разделение пар энантиомеров (разрешение больше 1.5). Однако, при более высоких концентрациях хирального селектора (об. 4 - 10 %) разрешение снова падает. При более высоких концентрациях ЦД время пребывания D- и L-форм анализируемых веществ в ЦД увеличивается, однако разность этих времен постоянно уменьшается.

Тем самым, разрешение пиков при разделении в этой системе уменьшается или даже совершенно исчезает. Экстремальный случай оптимизации концентрации ЦД приведен на рис. 87.

При очень низких концентрациях хирального селектора в системе достигается хорошая селективность. Если повысить концентрацию, разрешение полностью исчезает и снова появляется при очень высоких концентрациях ЦД. Это показано на рис. 88, где представлены зависимости относительных времен миграции от концентрации ЦД.

Хорошо видно, что относительная миграция с ростом концентрации ЦД резко падает и примерно при об. 6% достигает минимума. В этой области разрешение зависит только от различия времен нахождения D- и L-форм в ЦД. При концентрациях больше об. 6% подвижность анализируемых веществ практически не изменяется. Следует отметить,

что разрешение снова возрастает при концентрациях ЦД больше об. 12%. Это можно объяснить только тем, что при высоких концентрациях образуются диастереомерные комплексы между ЦД и анализируемым веществом. Диастереомеры по своей природе проявляют различные физические свойства, и поэтому их можно разделить. Из-за различия механизмов разделения в начале и конце кривых последовательность выхода энантиомеров неизбежно обращается.

11.6. Оптимизация значений pH

Значение pH в КЭ является одним из важнейших параметров оптимизации. С помощью значений pH можно не только воздействовать на ЭОП, но и перевести анализируемые вещества в определенную ионную форму. Из этого вытекают различные электрофоретические подвижности, которые приводят затем к разделению анализируемых веществ. Если используются незаряженные ЦД, пара энантиомеров при определенном pH должна иметь такую собственную подвижность, чтобы смогла пройти сквозь псевдостационарную фазу (в данном случае - ЦД).

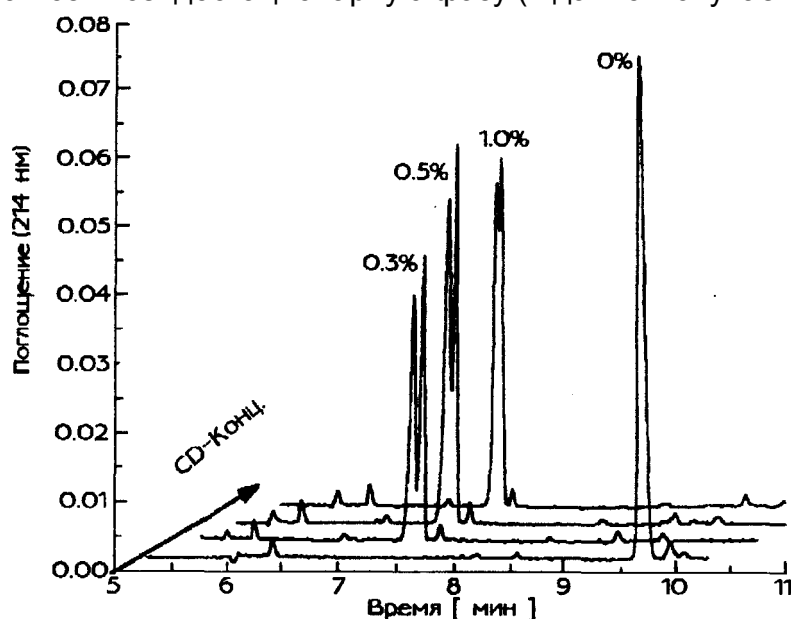


Рис. 86. Влияние концентрации гидроксипропил-β-ЦД на разрешение пиков при разделении производных дигидропириди-на. Условия разделения: $L=50/57$ см, $E=350$ В/см; буфер: 0.1 М Т ВЕ, pH 8.3, различные концентрации ЦД, детектирование при 214 нм.

На рис. 89 в качестве примера представлена зависимость разделения рацемированной смеси от значения pH. При низких значениях pH анализируемые вещества практически не обладают собственной подвижностью и проходят через детектор со скоростями, близкими к ЭОП, не разделяясь. Из рис. 89 также видно, что при низких значениях pH ЭОП очень мал.

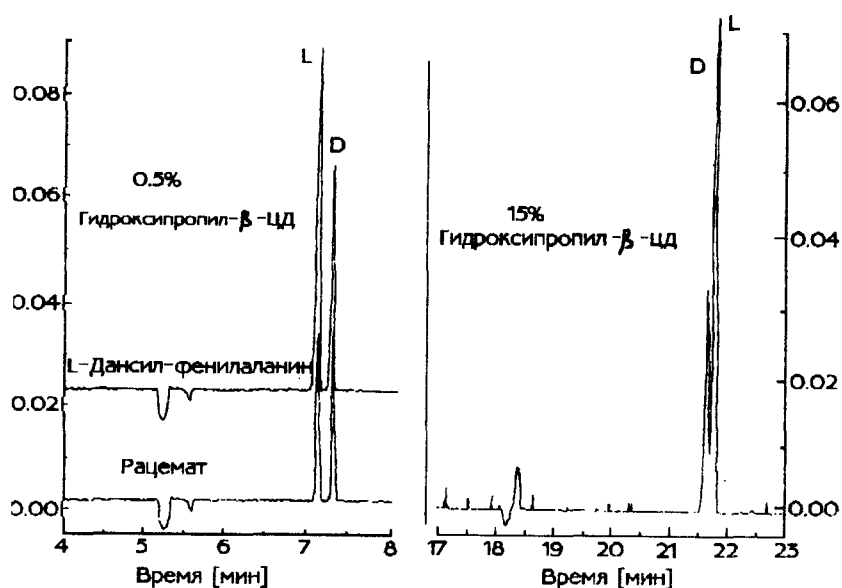


Рис. 87. Изменение последовательности выхода энантиомеров при различных концентрациях ЦД. Условия разделения (слева): $L=50/57$ см, $E=350$ В/см, 20 мМ фосфатный буфер, pH 7.7 с об. 0.5 % гидроксипропил-β-ЦД. (Справа): $L=80/87$ см, $E=30$ В/см, 20 мМ фосфатный буфер, pH 7.0 с об. 15% гидроксипропил-β-ЦД; детектирование при 214 нм.

При средних значениях pH анализируемые вещества обладают достаточно высокой собственной подвижностью, так что в этом случае различие в подвижности между D- и L-формами может привести к переносу. Анализируемые вещества в данном случае должны пройти достаточно большой эффективный участок пути в капилляре. Потеря разрешения при высоких значениях pH часто объясняется тем, что очень высокий ЭОП не дает достаточно времени анализируемым веществам для разделения в капилляре. Высокий ЭОП приводит к слишком коротким временам пребывания анализируемых веществ в капилляре. При очень высоких значениях pH ЦД сами могут депротонироваться, из-за чего селективность снова изменяется. Если ЦД имеет одинаковый заряд с анализируемыми веществами, из-за электростатического отталкивания хиральные отличительные черты теряются.

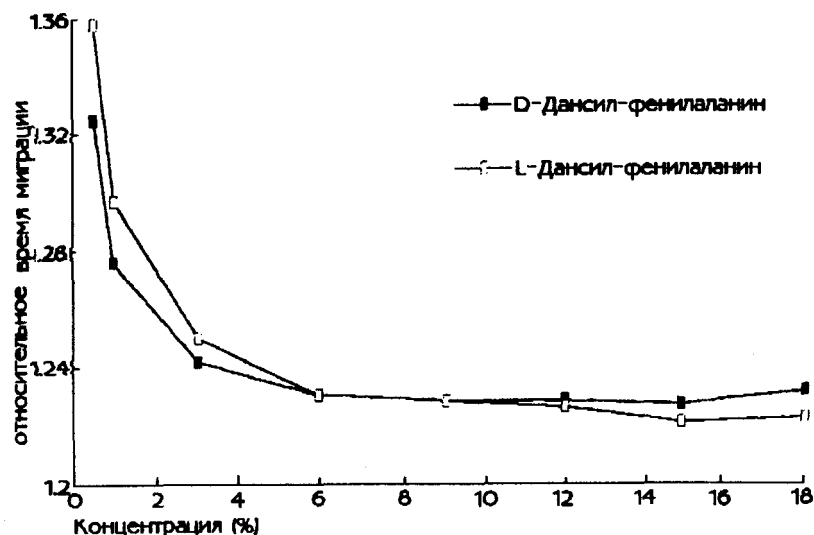


Рис. 88. Зависимость относительных времен миграции D- и L-дансил-фенилаланина от концентрации гидроксипропил-р-ЦД.

11.7. Оптимизация фоновых электролитов

После выбора подходящего хирального селектора и оптимального значения pH следует оптимизировать также ионный состав разделяющего буфера. Как показано на рис. 90, подвижность буферных ионов влияет на форму пика и разрешение анализируемых веществ.

Во всех трех случаях выдерживались одинаковые условия ввода пробы, и все условия разделения, за исключением буферных ионов, поддерживались одинаковыми. Ясно видно, что в случае применения в качестве буфера лимонной кислоты получается лучшее разрешение и, как следствие, более высокая эффективность разделения. Это приводит также к большей чувствительности системы. Этот пример показывает, что и при низких значениях α путем улучшения эффективности можно достичь достаточного хорошего разрешения анализируемых веществ.

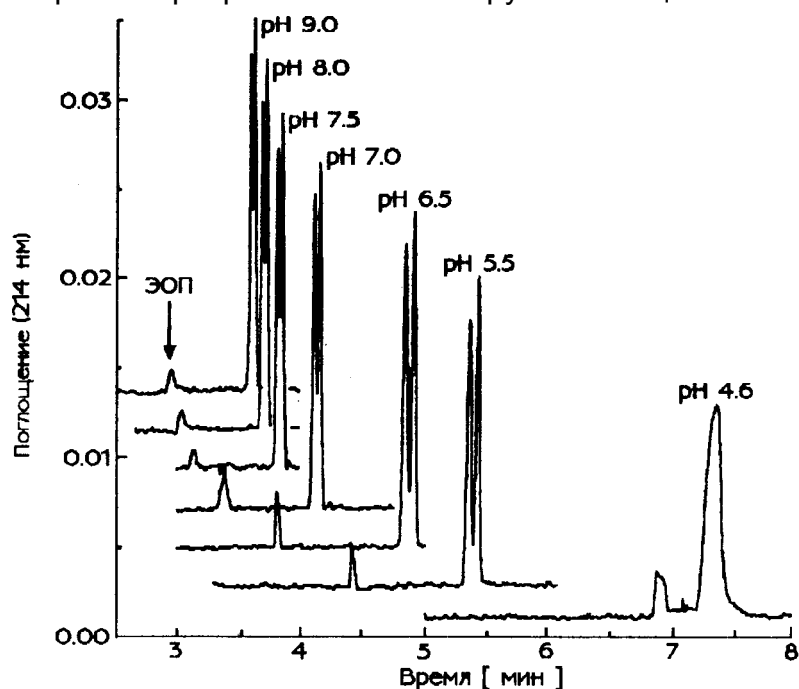


Рис. 89. Влияние значений pH на разделение производных дигидро-пиридина. Условия разделения: L=50/57см, E=440 В/см, буфер: 20 мМ фосфат, об. 0.4 % гидроксипропил- β -ЦД, раз-

11.8. Буферные добавки

Наряду с уже описанными параметрами определяющее влияние на разделительную способность хирального селектора могут оказывать многие добавки к разделяющему буферу. Однако заранее невозможно предсказать, может ли добавка таких компонентов, как органические растворители, комплексообразующие средства, детергенты и т.д., привести к улучшению или исчезновению разделения.

В некоторых публикациях предпринята попытка представить модель такого поведения. В нижеописанном уравнении приведены основные факторы, влияющие на различия подвижностей.

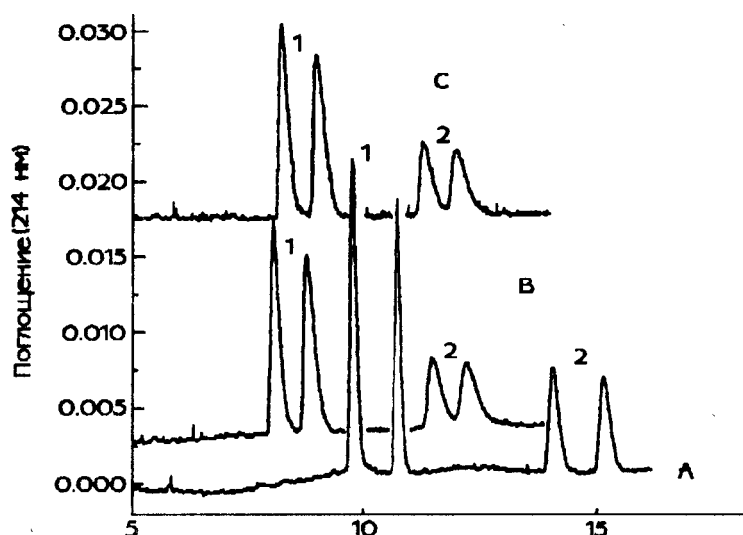


Рис. 90. Влияние фонового электролита на форму и разрешение пиков. Условия разделения: $L=20/27$ см, покрытие полиакриламидное, $E=370$ В/см (выход заземлен), об. 0.3% гидроксипропил- β -ЦД, детектирование при 214 нм, пробы: дансил-фенилаланин (1), производное дидагидропиридина (2). А) 10 мМ лимонная кислота, pH 6.0. В) 25 мМ MES/Трис, pH 6.0. С) 20 мМ фосфатный буфер, pH 6.0.

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_1 - \mu_2)(K_B - K_A)}{1 + [C](K_A + K_B + K_A K_B [C])^2}$$

Здесь

$\Delta\mu$ - разность подвижностей энантиомеров,

μ_1 - подвижности энантиомера 1 или 2 в свободном растворе,

μ_2 - подвижности комплексов "энантиомер-ЦД",

$[C]$ - концентрация хирального детектора,

K_A , K_B - константы равновесия между энантиомером А или В и ЦД.

Разность подвижностей и, соответственно, селективность зависят в основном от концентрации ЦД, констант равновесия между анализируемыми веществами и хиральным селектором и разности подвижностей в комплексном и некомплексном состояниях анализируемых веществ. Из вышесказанного следует, что при постоянной концентрации ЦД добавка органического компонента к буферу может изменить константу равновесия в положительную (улучшение разрешения) или отрицательную (потеря разрешения) сторону. Характер изменения зависит в основном от концентрации ЦД.

На рис.91 представлено влияние мочевины, метанола и ДДСН на время миграции, проявление пика и разрешение. Для буферного раствора, насыщенного β -ЦД (об. 1.56%), в данном примере наблюдается наиболее быстрое время миграции (А).

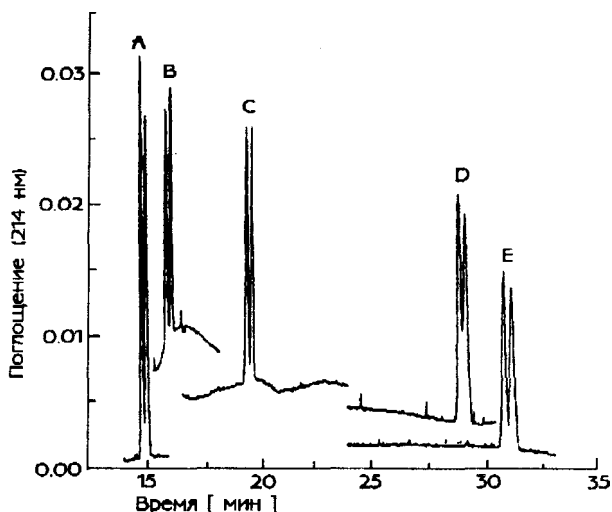


Рис. 91. Влияние буферных добавок на разделение энантиомеров. Условия разделения: $L=40/47$ см, $E=232$ В/см, (анод на стороне детектора), капилляр с покрытием (4% линейный полиакриламид), детектирование при 214 нм; буфер: 0,1 М ТВЕ, рН 8.3, добавки-.А) об. 1.56% β -ЦД.В) об. 12% β -ЦД, 7 М мочевины, 0.1% ДДСН.С) об. 12% β -ЦД, 7 М мочевины, 10% метанол, 0.1 М ДДСН.Д) об. 12% β -ЦД, 7 М мочевины.Е) об. 12% β -ЦД, 7 М мочевины, 10% метанол.

С помощью добавки раствора 7 М мочевины можно поднять концентрацию ЦД (случай D). Однако, в данном случае время анализов заметно растет вследствие увеличения вязкости буфера и низкой подвижности анализируемых веществ, обусловленной высокой концентрацией хирального селектора. При этом улучшения разрешения не наблюдается. В данном случае положительное влияние оказывает добавка метанола (Е). Время миграции при этом несколько возрастает, однако достигается лучшее разрешение. Если использовать буфер, соответствующий случаю D, вместе с 0.1 М ДДСН, время миграции резко уменьшается (случай В). Это объясняется тем, что в данных условиях ДДСН и анализируемые вещества движутся в одном направлении (оба анионные), тем самым создается синергический эффект. Разрешение по сравнению со случаем (D) резко улучшается, а время анализов уменьшается. И в этом случае добавка метанола в буферную систему приводит к увеличению времени анализов, однако улучшения разрешения не наблюдается (случай С). В рассматриваемых здесь случаях улучшение разрешения определяется в основном более высокой эффективностью конкретной разделяющей среды. Значения α в этих примерах практически не изменяются.

12. Капиллярный геле-электрофорез

Сильный подъем в применении КЭ, особенно КГЭ, а также появление в продаже промышленных приборов связаны с американским проектом "Геном человека". С помощью метода КГЭ практически полностью были разделены молекулы ДНК в реакции определения последовательности нуклеотидов ДНК или остаточных фрагментов. Из применяемых типов гелей в классическом планарном гелевом электрофорезе в капиллярах в качестве матриц применяют в основном акриламид, агарозу и целлюлозу. Эти гели очень сильно различаются по своим физическим свойствам, таким как вязкость, стабильность в электрическом поле, пористая структура и размер пор.

Применение гелей в электрофорезе основано на том, что биополимеры с точки зрения зарядов являются полианионами или поликатионами с одинаковыми поверхностями, поэтому разделение в постоянном электрическом поле без дополнительных вспомогательных средств становится невозможным. Поскольку эти биополимеры в самом деле резко различаются по своим размерам, добавка некоторого геля может сильнее влиять на подвижность полимера с большими размерами молекул. Это приводит впоследствии к разделению молекул по размерам, т.е. по растущим ММ. Основной областью применения гелевого электрофореза является разделение молекул ДНК, а также разделение белков, которые подвергаются денатурированию в растворе ДДСН. Кроме того, гели в классическом электрофорезе применяются обычно в качестве стабилизаторов, хотя и не дающих вклад в разделение.

Ниже будут рассмотрены некоторые типы гелей и показаны основные области их применения в КЭ.

12.1. Гели на основе акриламида

В общем случае различаются гели, обладающие определенной степенью

поперечной сшивки (поперечносшитые гели), состоящие из двух мономеров, и гели, состоящие только из одного мономера (линейные гели). Последние сплетены только из линейных полимерных цепочек, и их связи основаны только на физическом взаимодействии (физические гели). Поперечносшитые гели, в отличие от линейных, состоят из отдельных полимерных цепочек, поперечно связанных друг с другом и, тем самым, обладают более жесткой структурой (химические гели), поскольку между волокнами существуют ковалентные связи. К тому же эти гели содержат в достаточном количестве поры определенного размера, что обеспечивает их высокую разделительную способность.

На рис. 92 представлены структуры применяемых радикалов-стартеров и мономеров, а также схематический разрез гелевой структуры. Сравнение "линейного" и "сшитого" полиакриламидов представлено на рис. 93.

12.1.1. Поперечносшитые полиакриламидные гели

Важнейшей предпосылкой применения геля (в классическом смысле) в капилляре является полное исключение ЭОП.

Если это условие не выполняется в достаточной степени, гель вымывается из капилляра наружу, и разделение становится невозможным. Регулирование ЭОП достигается нанесением слоя или химическим модифицированием капилляра, которые уже подробно рассматривались в разделе о способах нанесения покрытий капилляров.

За то время, когда раствор мономера смешивают с радикалом-стартером и катализатором и быстро заполняют капилляр, гель в капилляре полимеризуется.

В некоторых случаях покрытия стенок капилляра, например, виниловыми группировками, гель при полимеризации в капилляре может сшиваться с нанесенным поверхностным слоем. Этот способ дает высокую целостность покрытия капилляра и, как следствие, приводит к очень высокой эффективности. Используя этот метод с применением поперечносшитых и связанных со стенкой капилляра ковалентными силами гелей, удалось получить наивысшие эффективности в КЭ (30 млн. теоретических тарелок на метр).

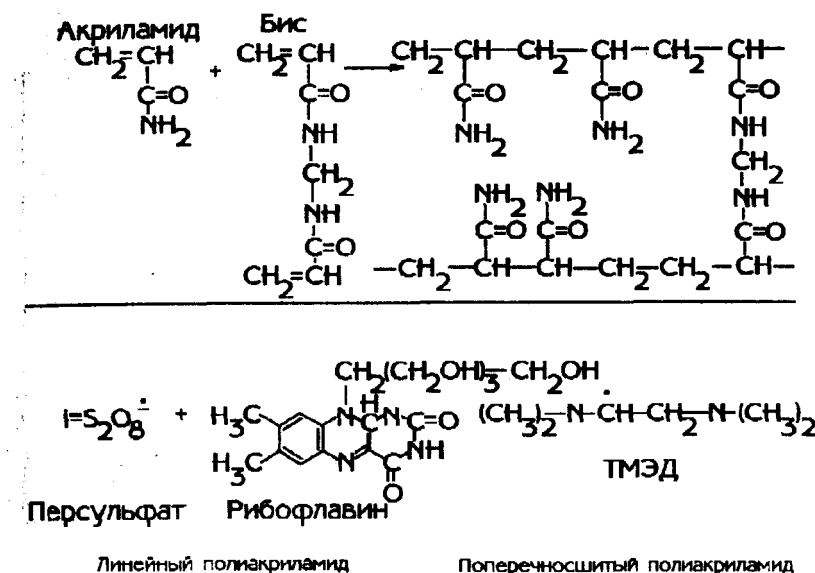


Рис. 92. Структура мономера - акриламидного геля с разрезом гелевой структуры. Показаны также структуры радикалов-стартеров.

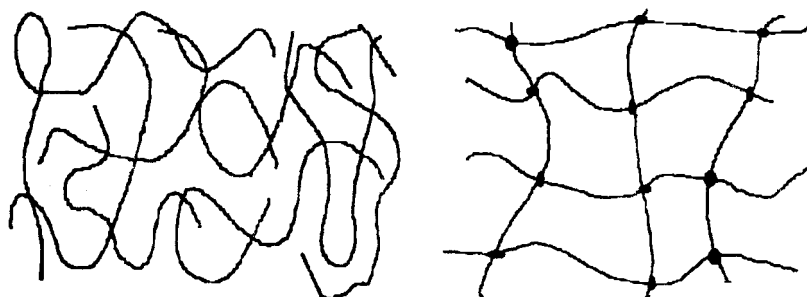


Рис. 93. Схема структуры линейного и поперечносшитого полиакриламидов.

Селективность гелей можно изменять с помощью выбора отношения концентрации наносимого мономера (%Т) к концентрации сшивающего агента (% С). Свойства поперечносшитых гелей на полиамидной основе приведены в таблице 28.

Таблица 28.

Области применения поперечносшитых полиакриламидных гелей.

Концентрация мономера	Свойства	Область применения
Различные соотношения % Т и % С в геле для управления селективностью	Жесткий гель, нетекучий, замена невозможна	Реакции определения последовательности нуклеотидов в ДНК
	Чувствителен к температуре	Анализ олигонуклеотидов
	Стационарно связан в капилляре	Гиалуроновые кислоты Олигосахариды
	Высокая целостность покрытия капилляра	ДДСН-белковые комплексы

Однако, перечисленные гели имеют некоторые недостатки:

- во время хранения капилляров, заполненных такими гелями (в отсутствие смачивания концов капилляра буфером) гель на концах капилляра может высохнуть, и, таким образом, капилляр становится непригодным для дальнейшей работы,
- обмен в среде буфера в капилляре невозможен или требует длительного времени,
- термостабильность такого рода гелей недостаточна. Растворенные газообразные компоненты буфера при высоких температурах образуют пузыри в капилляре. Похожий эффект наблюдается также в сильных полях (>500 В/см). Образование воздушных пузырей в капилляре, заполненном гелем, всегда приводит к локальным нарушениям геля и непригодности капилляра,
- поскольку для разделения применяют всегда один и тот же гель, неизбежны явления старения, вызванные "обескровливанием" геля. По сравнению с этим в классическом гелевом электрофорезе применяют всегда только одну зарядку гелем на один анализ, что может устранить этот эффект,
- изготовление самодельных капилляров (как было принято) требовало многих "ноу-хау" при модифицировании поверхности и, особенно, при проведении полимеризации в капилляре.

Эти проблемы стали причиной того, что попытки промышленного выпуска таких капилляров потерпели неудачу. На рис. 94 в качестве примера показана огромная производительность при разделении олигонуклеотидов таким поперечносшитым полиакриламидным гелем.

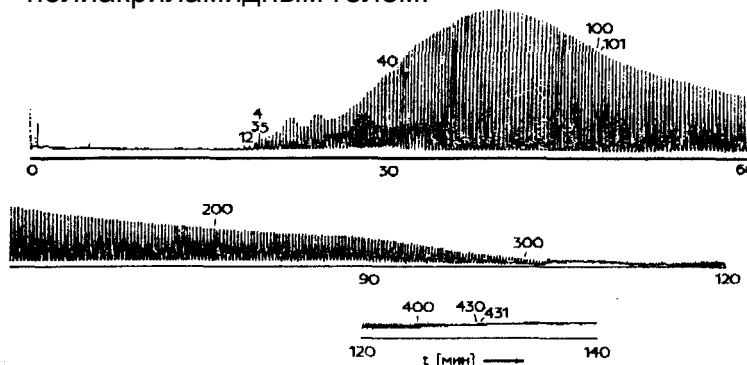


Рис. 94. Разделение поли(уридин-5'фосфата). условия разделения: $L=45$, $E=300$ В/см, буфер: 0.1 М Трис, 0.25 М борная кислота, 7М мочевины, 6% Т, 5% С, полиакриламид, детектирование при 260 нм.

12.1.2. Линейные полиакриламидные цепи.

Вышеописанные проблемы в основном преодолеваются при применении в капиллярах несшитых гелей. Свойства этих гелей при их использовании в капиллярах сильно зависят от концентрации мономера. В таблице 29 приведены свойства и

Области применения и свойства линейных полиакриламидных гелей различной концентрации.

Чистые акриламидные гели (Линейные, не поперечносшитые полиакриламидные гели)		
Концентрация мономера (об. % Т)	Свойства	Область применения
0-6	Жидкий. Замена после каждого анализа	Остаточные фрагменты ДНК
6 -9	Высоковязкий (еще летучий)	Остаточные фрагменты ДНК
	Замена под высоким давлением после каждого анализа	Анализ последовательности нуклеотидов в ДНК Олигонуклеотиды ДДСН-белковые комплексы
9- 12	Желати мообразный жесткий гель, уже нетекущий	Анализ последовательности ДНК Олигонуклеотиды ДДСН-белковые комплексы

При низких концентрациях мономера акриламида уже нельзя говорить о геле в обычном смысле этого слова, поскольку до концентрации примерно 4% Т имеет место только жидкий, хорошо текучий высокомолекулярный раствор полимера. Эти полимерные растворы можно назвать также "жидкими гелями", "полимерными матрицами" или "буфером с ситовыми свойствами". Такие растворы можно вводить в капилляр под давлением, под которым они находятся в сосуде с буфером. Это делает возможной легкую замену "жидких гелей" в капилляре после каждого анализа. Тем самым, перед каждым разделением будет иметься в распоряжении свежая, ненапряженная разделительная матрица, что отражается положительно на стабильности метода и результатах анализа. Таким образом, в данном случае образование пузырей и высыхание капилляра исключаются. Это показано на рис. 95, где приведены данные после 400 анализов, показывающие, что капилляр все еще работоспособен.

Для достижения высокой эффективности и селективности и в этом случае следует останавливать ЭОП. Любой поток внутри капилляра уменьшает эффективность разделения. Следует также упомянуть, что в случае применения этих гелей возможна также работа с капиллярами без покрытия. В общем случае разрешение будет хуже, причем разделение начинается при достаточно высоких ММ. В покрытых капиллярах разделяются вещества с достаточно длинными цепочками.

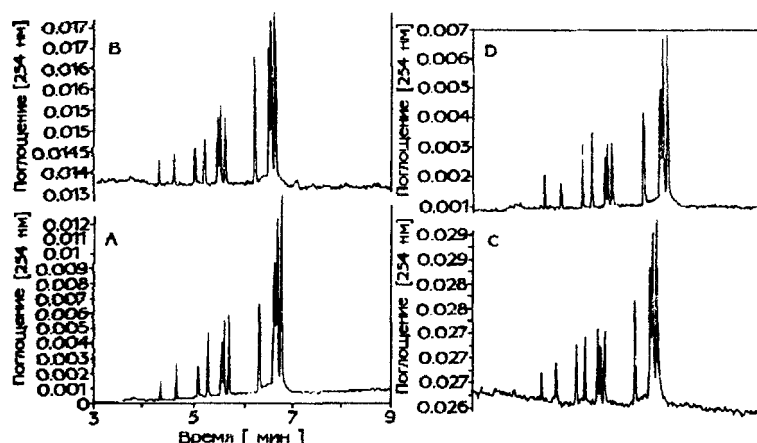


Рис. 95. Тест на стабильность капилляра, покрытого линейным полиакриламидом (ЛПА). Условия разделения: $L=30/37$ см, $E=300$ В/см, температура 30°C , 3% Т,

0% С, ЛПА, 0.1 М ТВЕ, рН 8.3. Проба: Phi X 174 РФДНК Нае III; А - 1-ый, В - 144-ый, С - 344-ый, D - 420-ый опыты.

На рис. 96 показано разделение остаточных фрагментов в капилляре, покрытом линейным гелем (3% Т, 0% С). Поскольку все фрагменты присутствуют в эквимольных соотношениях, но большие фрагменты обладают большим числом адсорбционных центров, с ростом длины цепочек растет и площадь пиков. По этой причине маленькие фрагменты дают маленькие пики и, вследствие малого сопротивления миграции в геле, на фореграммах проявляются в первую очередь. Нумерация фрагментов ДНК в данном случае проводилась в предположении роста молекулярных размеров. Число ступеней разделения здесь равно примерно 600 тысячам теоретических тарелок на метр. При таких высоких числах ступеней разделения капилляры желательно располагать в горизонтальном положении, поскольку поворот капилляра может привести к потере эффективности. Эти потери эффективности, зависящие от расположения капилляра, наблюдаются в КЭ при очень высоких эффективностях (> 1 млн. теоретических тарелок).

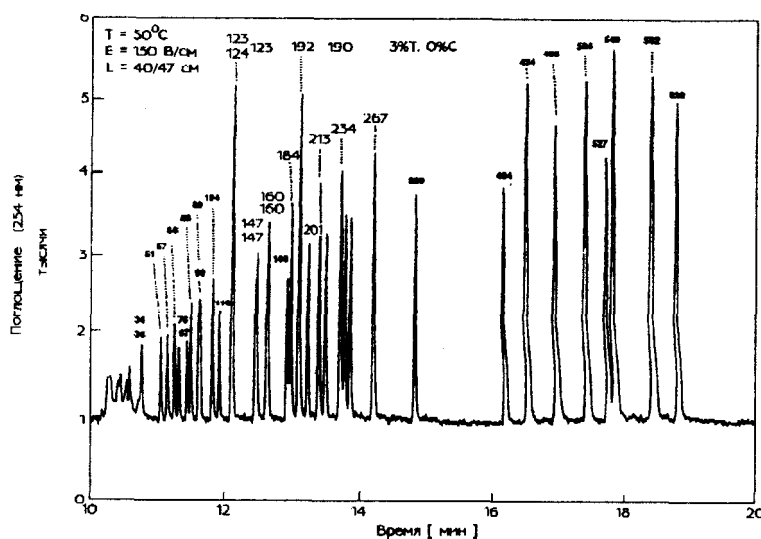
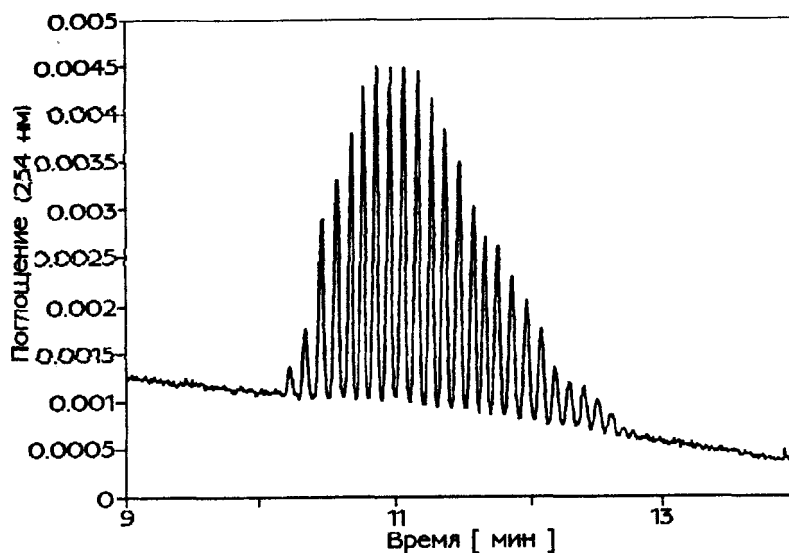


Рис. 96. Разделение остаточных фрагментов ДНК в капилляре, покрытом ЛПА. Условия разделения: $L=40/47$ см, $E=150$ В/см, $T=50^\circ\text{C}$. Буфер: 0.1 М ТВЕ, рН 8.3, 3% Т, 0% С ЛПА, пробы: рВР 322 МСП I, рВР 322 Нае III, детектирование: 254 нм.

Большое влияние на селективность и эффективность оказывает также температура. Вообще эффективность падает с ростом температуры, однако для фрагментов некоторых размеров может достигаться лучшее разрешение, что обусловлено улучшающейся селективностью. Влияние температуры, напряженности поля, пористой структуры геля и буферных добавок на селективность и последовательность миграции анализируемых веществ будет рассматриваться в дальнейшем при обсуждении моделей миграции.

В случае более высоких концентраций мономера растворы полимера становятся высоковязкими, поэтому начиная с концентрации 8% их следует полимеризовать в капилляре. Селективность этих высокомолекулярных линейных гелей (например 12% Т)



схожа с селективностью поперечносшитых гелей, которые всегда следует полимеризовать в капиллярах. Поскольку, однако, в таких гелях не образуются ковалентные связи цепочек между собой, а также со стенками капилляров, сильное напряжение геля не приводит к разрушению его структуры.

Эта незафиксированность цепочек в геле придает полимеру большую гибкость и, вследствие этого, повышает его продолжительность жизни. На рис. 97 представлено разделение олигонуклеотидного стандарта в покрытом капилляре,

заполненном 12% Т ЛПА.

Рис. 97. *Разделение смеси полидеоксиаденозида (pd (A) 40-60) с олигонуклеотидами в капилляре, заполненном гелем 12 % Т, 0% С . Условия разделения: L=30/37 см, E=300 В/ см; буфер: 0.1 М ТВЕ, 7 М мочевины, pH 8.3.*

Эти гели находят применение также в определении последовательности нуклеотидов в ДНК, причем для детектирования в данном случае применяют лазерно-индуцируемую флуоресценцию. Гели непроницаемы для УФ-лучей с длиной волны меньше 250 нм. Кроме того, поскольку в распоряжении имеются очень малые пробы, в данном случае требуется очень высокая чувствительность детектора. Граница определения в данном случае составляет примерно 10^{-11} М.

12.1.3. Полиакриламидный гелевый электрофорез белков с ДДСН

КГЭ применялся почти исключительно для разделения молекул ДНК, поскольку чувствительное определение белков в гелях, заполненных капиллярами невозможно из-за поглощения самого полиакриламида в области относительно коротких УФ-лучей (<250 нм). Взаимодействия белков с гелями также могут играть определенную роль, так что до настоящего времени в гелях, заполненных капиллярами описано только успешное разделение белков, денатурированных ДДСН.

Обычно белки соответственно своим значениям pI обладают различным зарядом молекул, на этом основано их разделение при применении нормальных буферных систем в условиях, исключающих денатурацию. Для достижения разделения по ММ белки должны обладать одинаковым отношением заряда к поверхности. В этом случае возможно разделение в геле по молекулярным размерам или ММ.

Белки полностью денатурируются в избытке ДДСН и 2-меркаптоэтанола (разрушение дисульфидных мостиков). Возникающие цепочки полипептидов связывают независимо от своих размеров и структуры постоянное количество ДДСН (1,4 г ДДСН/1 г белка). Поскольку ДДСН гасит заряды белково-детергентных комплексов, все белки, обработанные таким способом, будут иметь одинаковые соотношения зарядов на единицу массы. Из этого следует, что подвижность в буферной среде без "ситовых свойств" будет однородна. Если использовать теперь гель, то измеряемая подвижность анализируемых веществ будет пропорциональна эффективным ионным радиусам и, следовательно, ММ этих веществ (цепочек полипептидов). Из линейной зависимости между логарифмом ММ и временем миграции можно определить ММ белка. На рис. 98 показано разделение ДДСН белкового стандарта с высокой ММ.

Таким образом, полиакриламидный гелевый электрофорез с ДДСН представляет собой метод, альтернативный методу ИЭФ и применяется также в классическом 2D-электрофорезе (ИЭФ, совмещенный с ДДСН-ПААГ-электрофорезом) в качестве высокоразрешающего способа разделения.

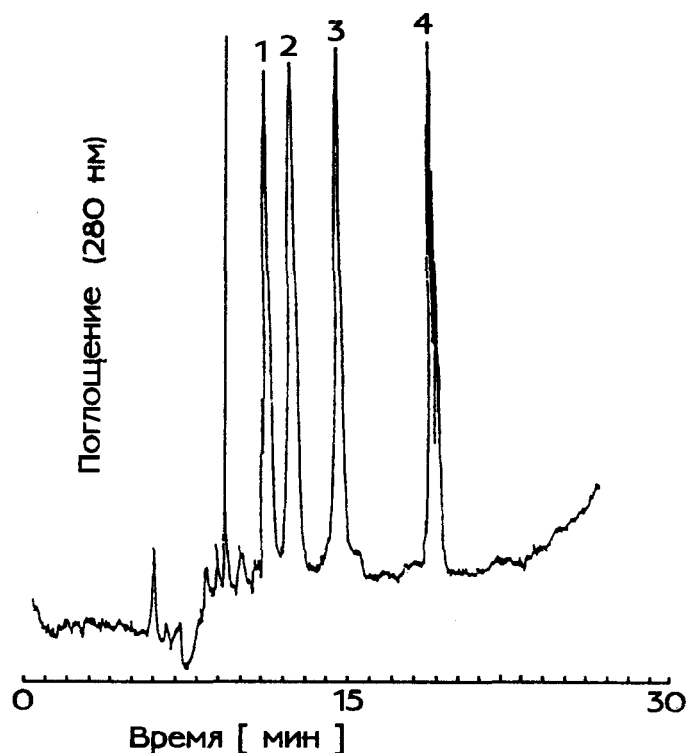


Рис. 98. Разделение белков большой ММ в поперечношитом полиакриламидном геле. Условия разделения: $L=20$ см (эффективная), $E=180$ В/см, буфер: 0.12 М Трис, 0.12 М гистидин, pH 8.8, 0.1 М ДДСН, 1% 2-пропанол, 5% Т, 1% С, полиакриламид. Проба: 1 - овальбумин, 2 - альбумин крупного рогатого скота, 3 - бета-галактозидаза, 4 - миозин.

12.2. Гели на основе полисахаридов и других полимеров

В КГЭ в качестве разделяющей среды наряду с полиакриламидными гелями применяют ряд других водорастворимых полимеров. В таблице 30 приведены используемые до настоящего времени полимеры и основные области их применения.

Таблица 30.

Полимеры, применяемые наряду с акриламидами для разделения в КГЭ.

Типы гелей	Используемые материалы	Применение
Агарозные гели	Агароза (в широких пределах)	Остаточные фрагменты ДНК (до 1300 основных пар), ДДСН-белковые комплексы
Целлюлозные гели	Гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) (SeaPlaque, SeaPrep) (различные концентрации)	Остаточные фрагменты ДНК (до -12000 основных пар)
	Метилцеллюлоза (0,5 %)	Остаточные фрагменты ДНК (до -20000 основных пар)
Декстраны	Декстраны различной концентрации (ММ 10000-2000000)	ДДСН-белковые комплексы
ПЭГ	ПЭГ различной концентрации (ММ 1000000)	ДДСН-белковые комплексы

Основным преимуществом этих разделительных матриц является их УФ-проницаемость в области длин волн ниже 260 нм. Низкая токсичность этих полимеров по сравнению с мономером акриламидом упрощает работу с этими растворами и их хранение. К тому же эти полимеры при применяемых концентрациях менее вязки, так что может проводиться их замена после каждого анализа. Однако, для некоторых длин ДНК они дают меньшую разрешающую способность, чем акриламидные гели. Эти гели

очень выгодно применять для разделения ДДСН-белковых комплексов, т.к. в данном случае их можно детектировать с большой чувствительностью при относительно коротких длинах волн (214 нм). В этом случае следует дополнительно оптимизировать выбор некоторых буферных сред, не поглощающих в УФ-области. На рис. 99 представлено разделение стандартного ДДСН-белкового комплекса в растворе декстрана, прозрачном по отношению к УФ-лучам. Три разделения показывают воспроизводимость при замене полимерных растворов в капилляре.

Различия между этими полимерными матрицами заключаются в основном в пористой структуре. Размеры пор и упругость встроенных в гель полимерных цепочек оказывают значительное влияние на работоспособность при разделении по молекулярным размерам. На рис. 100 представлена структура агарозного геля и ее формирование из мономерных волокон (слева). Гидроксиэтилагароза (рис. 100, справа) обладает сильно измененной структурой. Образование сдвоенной структуры приводит к сужению пор, и такой гель лучше применять для биополимеров с меньшими размерами.

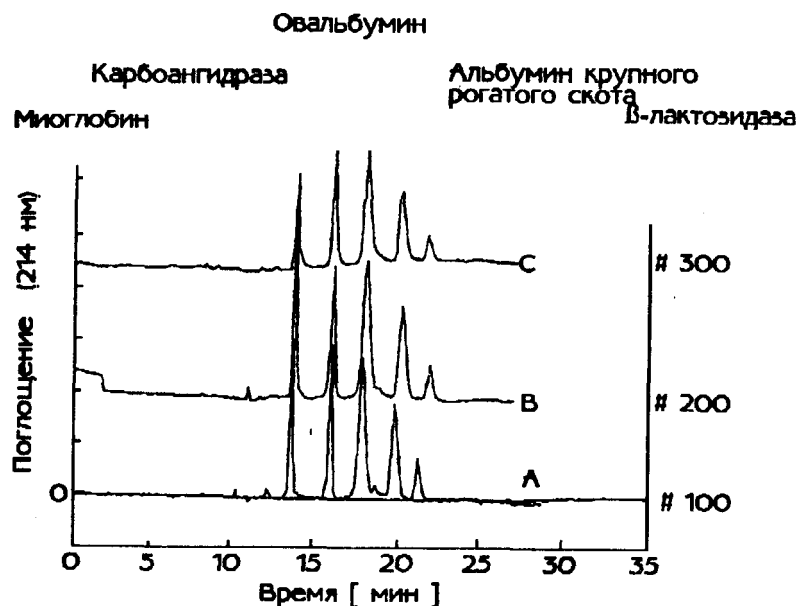


Рис. 99. Разделение ДДСН-белковых комплексов и стабильность капилляра при замене декстранового полимерного раствора. Условия разделения: $L=30$ см (эффективная), $E=300$ В/см, буфер: 0.06 М 2-амино-2метил-1-3-пропандиол/какодиловая кислота, pH 8.8, 0.1% ДДСН, об. 10% декстраи (ММ 2000000), детектирование: 214 нм.

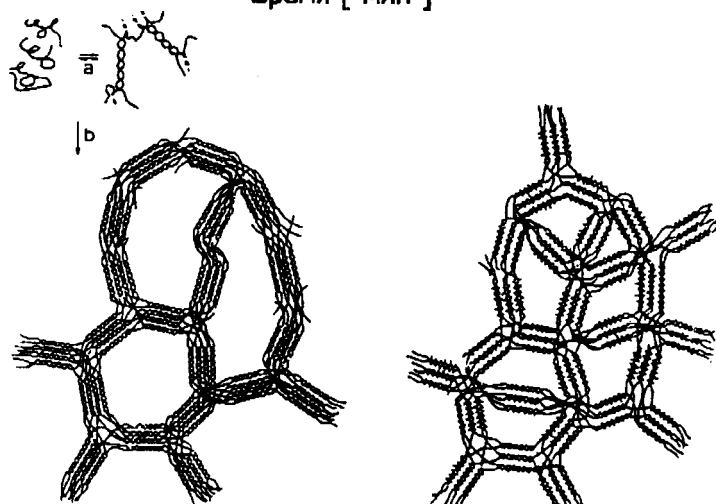


Рис. 100. Формирование агарозного геля и образование сдвоенной структуры. Слева - регулярная агароза, справа - гидрокси-этилагароза.

12.3. Модели миграции биополимеров в полимерных растворах

Поскольку подвижности молекул ДНК различных размеров в свободных растворах из-за одинаковых соотношений поверхность/заряд не различаются, разделение по молекулярным размерам может не достигаться. Это делает необходимым применять среду с ситовыми свойствами. Ситовые свойства в простейшем смысле описываются взаимодействиями молекул анализируемых веществ с волокнами разделяющего полимера (геля).

В зависимости от размеров пор и длин биополимеров между полимерными волокнами имеют место различные конформации анализируемых веществ. Эти конформации отвечают за различные подвижности и возникающие нерегулярности.

Ясно, что молекулы в компактной или разреженной конформациях обладают подвижностью, отличной, например, от подвижности молекул вытянутой формы. Конформации можно наблюдать с помощью лазерной флуоресцентной микроскопии.

Для различных взаимодействий молекул ДНК обсуждаются различные механизмы разделения. Сила взаимодействия с полимерной матрицей больше для больших молекул ДНК, на этом и основано разделение по молекулярным размерам. В зависимости от конформации и размеров молекул анализируемых веществ (биополимеров), а также от пористой структуры полимерного раствора (геля) можно прийти к различным механизмам разделения. Как правило, для подвижности анализируемых веществ в разделяющем полимере находят зависимость от размеров молекул анализируемых веществ. Такая зависимость показана на рис. 101.

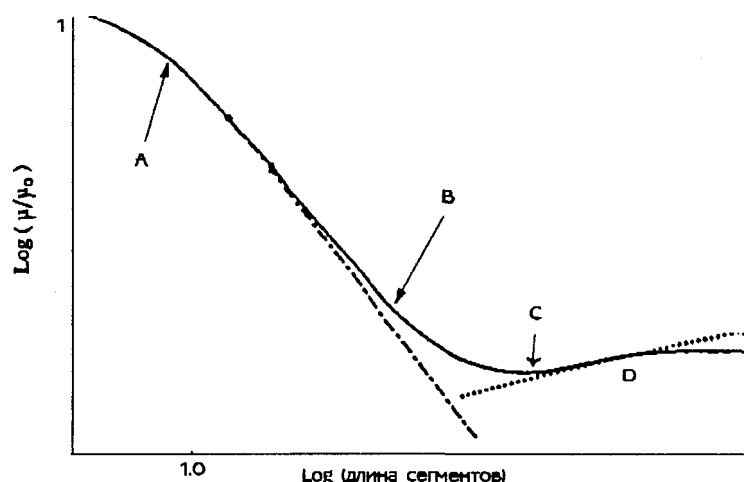


Рис. 101. Зависимость логарифма подвижности анализируемых веществ от логарифма длины сегментов этих веществ при постоянном размере пор разделяющей матрицы.

Здесь можно выделить 4 области:

А) В начальной области кривой подвижность изменяется слабо с ростом длины анализируемых веществ, т.е. для маленьких фрагментов селективность невысока. В этой области, называемой областью Огстона, размеры пор геля больше, чем размеры самих молекул, которые без заметного сопротивления проходят через гель. При этом молекулы могут сохранять свою глобулярную структуру. Это является причиной низкой селективности в данной области размеров молекул анализируемых веществ.

В) В так называемой области рептации имеет место большое изменение подвижности анализируемых веществ с ростом длины их цепочек и, тем самым, высокая селективность. В этой области молекулы анализируемых веществ больше, чем поры геля, так что молекула может проникнуть в поры только в вытянутом состоянии, огибая в "змеевидном" движении волокна гелевой матрицы (рептация). Таким образом, могут возникнуть сильные взаимодействия анализируемых веществ с матрицей геля, что приводит к появлению максимума селективности.

С) При средних длинах цепочек анализируемых веществ достигается минимум подвижности. Это объясняется тем, что оба конца молекулы движутся в одном направлении и сильно переплетаются с волокнами разделяющего полимера (ловушка). Это приводит впоследствии к уже независимой от размеров молекул подвижности (аномальная миграция и даже инверсия). Однако это переплетение для маленьких молекул не играет существенной роли, т.к. они могут быстро освободиться от такой конформации. Для больших молекул вероятность выхода из такого состояния очень мала.

Д) В последней области при очень больших длинах молекул различия анализируемых веществ относительно их размеров становятся все меньше, что приводит в дальнейшем к отсутствию различий в подвижностях.

Как видно из рис. 102, экспериментально полученные зависимости согласуются с теорией. Однако, было обнаружено, что сильное влияние на правильную последовательность миграции (маленькие молекулы перед большими) и подвижность анализируемых веществ оказывают также температура, сила поля и концентрация геля. В экстремальных случаях может наблюдаться инверсия последовательности миграции, т.е. более длинные фрагменты ДНК движутся сквозь разделяющий гель быстрее, чем меньшие фрагменты ДНК. Это нежелательное явление можно в общем случае

устранить следующими способами:

- уменьшением напряжения налагаемого поля,
- повышением температуры в системе,
- уменьшением концентрации геля,
- буферными добавками.

Качественно нелинейность подвижности можно описать также моделью рептации:

$$\mu = (Q/3f) \left([1/N] + (qE_a/3k_bT)^2 + \dots \right)$$

Здесь μ - подвижность биополимера, Q - общий заряд молекулы, f - коэффициент трения между волокнами геля и полимером, N - число сегментов биополимера (число основных пар), q - заряд на величину N , E - сила поля, a - длина поры геля, T - температура и k_b - константа Больцмана. Из этого уравнения видно, что подвижность обратно пропорциональна длине цепочки только в том случае, когда второй член пренебрежимо мал. Это бывает только при работе с относительно слабыми полями (<200 В/см). Согласно этому соотношению следует работать при повышенных температурах, что также подтверждается на практике.

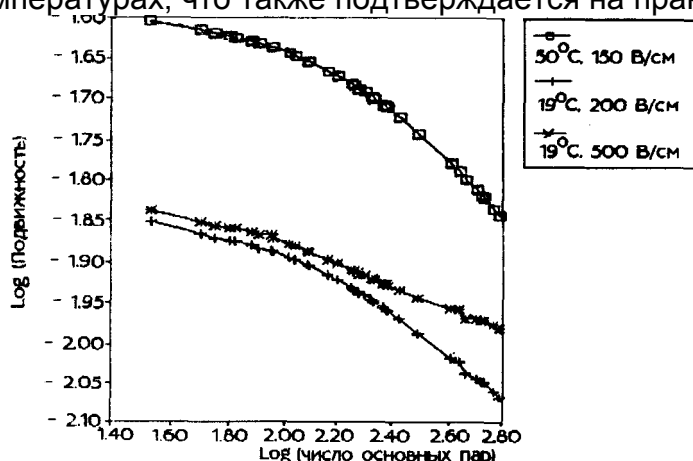


Рис. 102. Зависимость между подвижностями смеси остаточных фрагментов ДНК и числом основных пар в логарифмическом масштабе. Условия разделения: $L=40/47$ см, буфер: 0.1 М ТВЕ, pH 8.3, 3% Т, 0% С, ЛПА, различные температуры и силы поля (указаны на рисунке).

В зависимости от размеров пор геля и длины биополимера наблюдается различная конформация анализируемых веществ между волокнами полимера. Эти конформации в конце концов ответственны за различную подвижность и наблюдаемые нерегулярности. Ясно, что компактная или напряженная конформация вызовет подвижность, отличающуюся, например, от подвижности для вытянутой формы.

Конформации, показанные на рис. 103, можно наблюдать методом лазерной флуоресцентной микроскопии.

Вышеупомянутые модели миграции описывают и объясняют все наблюдаемые картины и аномалии. С помощью этих моделей можно также объяснить причины нелинейности между последовательностью миграции и размерами молекул и устранить их.

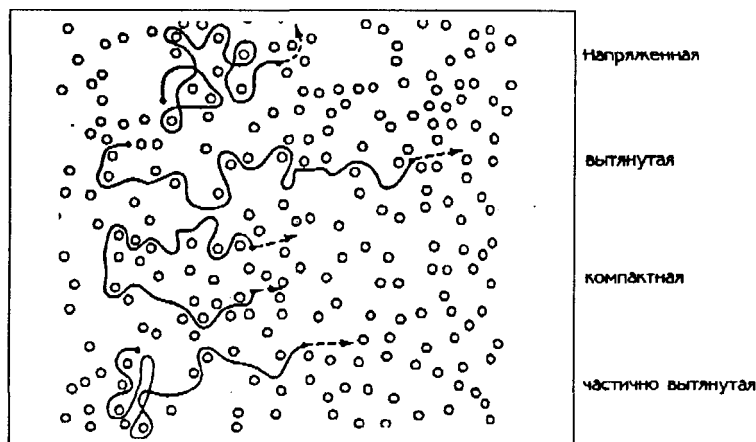


Рис. 103. Зависимость подвижности биополимеров от их конформации в разделяющем геле (см. также рис. 100).

13. Изоэлектрическая фокусировка (ИЭФ) в капиллярах

В классической форме электрофореза ИЭФ представляет собой разработанный способ разделения с высокой эффективностью. В основном он применяется для

цвиттерионов и амфотерных проб, таких как белки и пептиды, которые различаются не по своей подвижности, а по изоэлектрическим точкам (значениям p_i). Изоэлектрическая точка представляет собой специфическую величину для амфотерных веществ и показывает, при каком значении pH это вещество перестает двигаться в электрическом поле и внешне выглядит как электрически нейтральное. Таким образом, ИЭФ можно применять также для определения изоэлектрической точки белков и других амфотерных веществ.

Сначала необходимо вдоль участка разделения с помощью цвит-терионных соединений, так называемых амфолитов, создать градиент значений pH . В качестве амфолитов применяют смесь различных полиамино-поликарбокси-кислот, различающихся по своим значениям P_i .

Под влиянием сильной кислоты в анодном и сильной щелочи в катодном пространствах эти амфолиты при наложении напряжения располагаются согласно своим значениям p_i вдоль участка разделения и, тем самым, создают градиент pH (см. рис. 104).

Этот градиент в случае классического электрофореза на плоской подложке стабилизируется с помощью геля для удаления конвекционных потоков. Белки движутся под действием градиента pH до тех пор, пока сохраняют заряд. При значении pH , соответствующем их изоэлектрической точке, электрофоретическая миграция заканчивается. Высокая эффективность ИЭФ основывается на фокусирующем свойстве градиента pH , который практически не допускает уширения полос, вызванного диффузией. Амфолиты можно или добавлять к буферу, или ковалентно связывать с гелем (иммобилизованный градиент pH (ИГП)). Этот вариант ИЭФ вследствие очень крутого градиента pH ведет к очень высокой разделительной способности. Чем меньше различия в значениях p_i пробы, тем более резкие градиенты pH необходимо накладывать для того, чтобы обеспечить разделение этих проб.

При переносе ИЭФ на узкие капилляры применение стабилизирующих гелей не является безусловно необходимым. Правда, ЭОП необходимо полностью подавить для того, чтобы сделать возможным образование градиента pH , иначе ЭОП быстро вынесет раствор амфолита из капилляра и сделает невозможным проведение фокусировки. Управлять ЭОП можно, как уже отмечалось в одной из глав, модифицируя поверхность капилляра. Понижать ЭОП для проведения фокусировки можно также, добавляя высоковязкие полимеры, например, метилцеллюлозу, для повышения вязкости буферного раствора. Преимущество последнего способа заключается в том, что зачастую для ИЭФ необходимо применять очень высокие значения pH , а ковалентное покрытие капилляра не может долго выдерживать сильнощелочные значения pH .

В отличие от ИЭФ на плоской подложке в капилляре образование градиента pH и фокусировка белков протекают в одну стадию. Капилляр заполняют раствором амфолита, уже содержащим пробы, и катодный конец капилляра погружают в разбавленный раствор едкого натра, а анодный конец - в разбавленный раствор фосфорной кислоты. При наложении напряжения сначала протекает большой поток, поскольку амфолиты еще движутся до своей изоэлектрической точки и, тем самым, вносят вклад в общий поток. Окончание фокусировки выражается падением потока до постоянной небольшой величины. После того, как пробы сфокусированы и разделены в капилляре, они должны пройти через детектор. Это достигается в общем случае заменой катодного электролита (сильного основания) на сильно кислотный раствор или заменой анодного электролита (сильной кислоты) на сильное основание.

При этом проводящееся титрование разрушает градиент pH , отчего белки расфокусируются, и оказывается возможным транспорт белков к детектору. Другая возможность мобилизации белков состоит в том, что в капилляре они приводятся в движение по направлению к детектору путем наложения разности давлений (давление или разрежение). При этом, однако, напряжение должно оставаться включенным, чтобы противодействовать уширению полос в процессе детектирования. Поскольку фокусировка происходит во всем капилляре, т.е. в том числе и между ячейкой детектора и катодом, белки с крайне высокими значениями p_i могут уклоняться от детектирования. Этого можно избежать, заполняя капилляр едким натром вплоть до места детектирования.

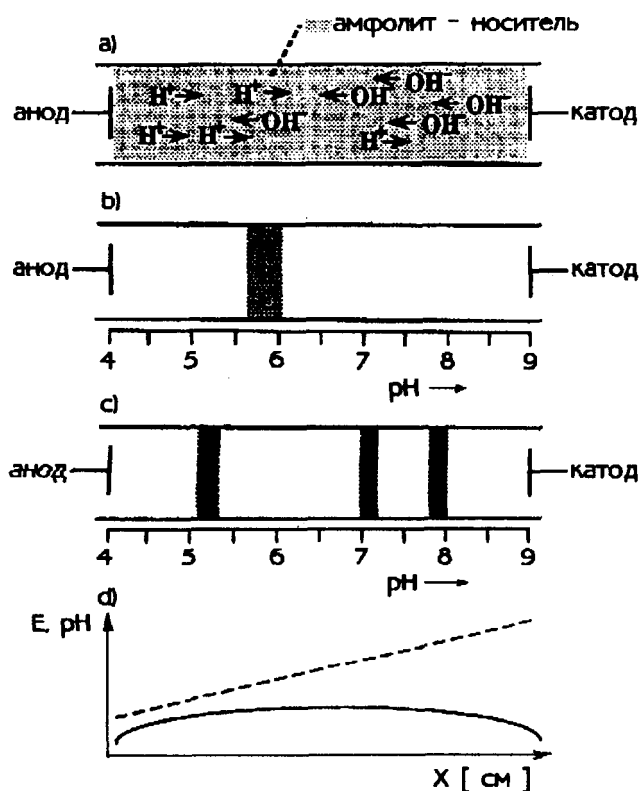


Рис. 104. Принцип ИЭФ: а) наложение градиента pH; б) ввод пробы; в) установление равновесия (устойчивое состояние); д) зависимость силы поля (сплошная линия) и значения pH (штрихи) от расстояния на участке разделения.

В качестве примера возможности ИЭФ в капиллярах представлены на рис. 105.

Модифицирование стенок капилляра динамическим или ковалентным способом допустимо также и в случае ИЭФ, поскольку здесь, как и в необработанном капилляре, белки сильно адсорбируются на стенках капилляра.

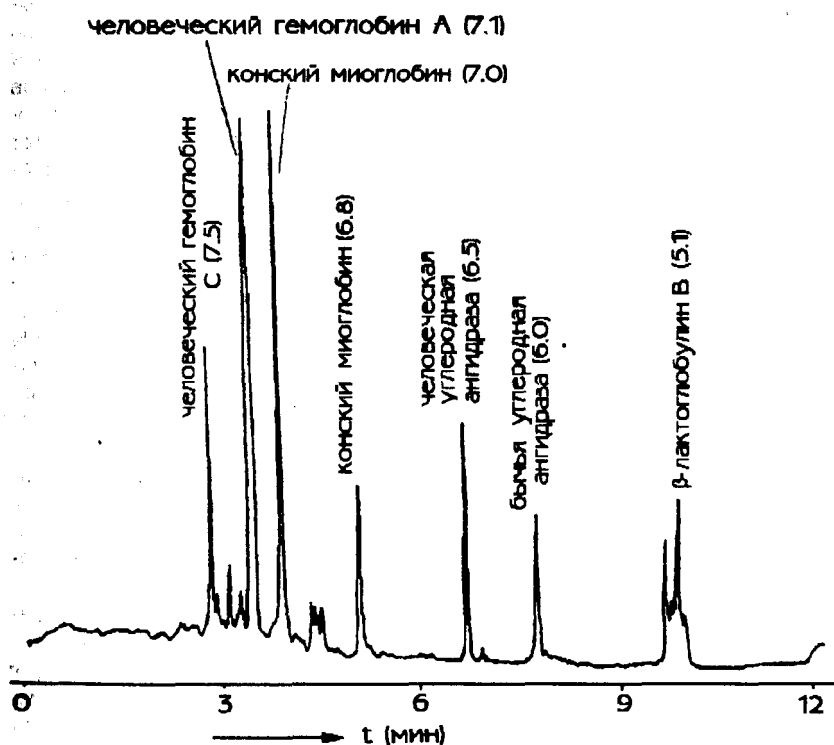


Рис. 105. Разделение 7 белков вследствие различия их изоэлектрических точек.

14. Изотахорофрез (ИТФ)

Если описанные до сих пор электрофоретические способы разделения в капиллярах соответствовали элюентной хроматографии (прерывистый ввод проб, постоянный состав элюента, различные скорости движения компонентов пробы), то метод ИТФ соответствует вытеснительной хроматографии. В обоих случаях все компоненты пробы движутся с одинаковой скоростью. ИТФ описан много лет назад и проводился тогда в основном в тefлоновых трубках. Однако из-за проблем выбора конкретных электролитов и ограничений в выборе детекторов (применимы только детекторы по электропроводности) этот метод было невозможно использовать в качестве точного аналитического метода. В случае ИТФ проба вводится между двумя электролитами с различными подвижностями ионов, выбранными так, чтобы они ограничивали подвижности компонентов пробы. Обычно ведущий электролит обладает наивысшей, а конечный электролит -наиболее низкой подвижностью из всех движущихся ионов. После достижения стационарного состояния все одинаково заряженные ионы движутся с одинаковыми скоростями. На рис. 106 это показано схематически. В каждой зоне при ИТФ имеется своя напряженность поля. Внутри каждой зоны напряженность поля постоянна, изменения происходят скачком на границах зон.

По этой причине методом ИТФ разделяли только анионы или катионы. Концентрационный ход в зонах описывается прямоугольной функцией: зоны следуют, как в вытеснительной хроматографии, непосредственно одна за другой. Применяя детектор по электропроводности, получают ступенчатый сигнал.

ИТФ преимущественно применяют для разделения неорганических ионов и органических карбоновых кислот. Из-за проблем детектирования и трудностей, связанных с нахождением подходящих электролитов, для проб неизвестного состава метод ИТФ неприменим. В частности, подходящие носители, т.е. электролиты, необходимы для белков и других сложных смесей, причем для того, чтобы разделять зоны друг от друга, носители должны обладать скоростью, промежуточной между скоростями движения проб. Из-за необходимости поиска подходящих носителей в анализе белков метод ИТФ едва ли найдет широкое применение в биоаналитике. ИТФ, как вытеснительная хроматография, способен концентрировать разбавленные пробы, поэтому он может быть использован на стадии предварительного концентрирования перед разделением методом КЭ. Этим разрешаются проблемы, связанные с дозировкой относительно больших объемов разбавленных проб.

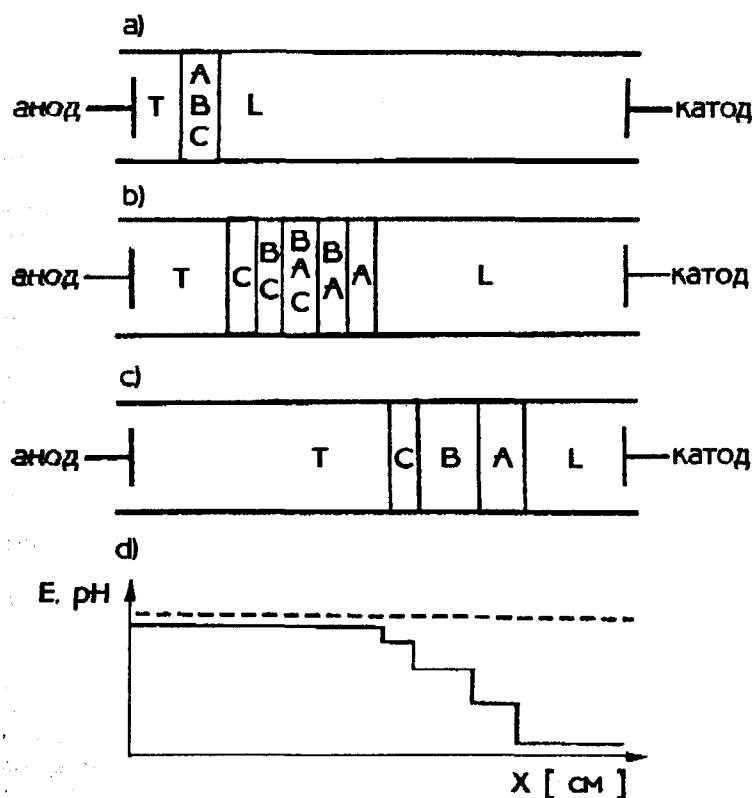


Рис. 106. Схема ИТФ.

Стадия обогащения (концентрирования) может проводиться непосредственно в разделительном капилляре КЭ. В капилляр, заполненный разделяющим электролитом, вводится короткая зона несущего электролита, вслед за которой вводится проба. При этом могут дозироваться объемы пробы порядка микролитров. Обогащение проходит в направлении несущего электролита, при этом возможно концентрирование в 100 раз. В случае белков схожий эффект дает добавка ацетата аммония к раствору пробы. Ион ацетата в данном случае действует как несущий электролит. Описано также сочетание двух аппаратов с двумя УФ-детекторами, ИТФ для концентрирования и КЭ для разделения. Когда сконцентрированная ИТФ-зона достигает первого детектора, система разделения КЭ переключается.

15. Электрохроматография (ЭХ)

Основной вклад в уширение полос в ВЭЖХ дают параболический профиль скоростей и диффузия в порах стационарной фазы. Одной из возможностей уменьшения этого вклада в уширение полос является уменьшение диаметра частиц, однако при этом возрастает перепад давления. В идеальном случае ЭОП в наполненном капилляре не зависит от размера частиц наполнителя. Кроме того, поршнеобразная форма профиля скоростей ЭОП способствует высокой разделительной способности. Поэтому пытаются соединить высокую селективность заполненной разделительной колонки ВЭЖХ с "остротой" разделения, свойственной КЭ. В данном случае основополагающие принципы разделения и стационарные фазы те же, что в ВЭЖХ, однако транспорт элюентов (водно-органических буферных растворов) и компонентов пробы обеспечивается миграцией под действием электрического поля. Для уменьшения вклада сорбционных процессов в уширение полос применяют очень маленькие непористые частицы (1 мкм). Следует отметить, что до настоящего времени в литературе нет реальных примеров применения, а есть только теоретические работы. Многообещающие теоретические предсказания до сих пор не подтверждены экспериментально. Получаемые малые ВЭТТ лишь незначительно отличаются от полученных в ВЭЖХ. Одной из причин этого может быть проблема детектирования. В КЭ детектируют с помощью разделяющего капилляра, в наполненной колонке это уже невозможно. Таким образом, дополнительно возникают известные в микро-ВЭЖХ проблемы, связанные с подключением детектора к разделяющему капилляру.

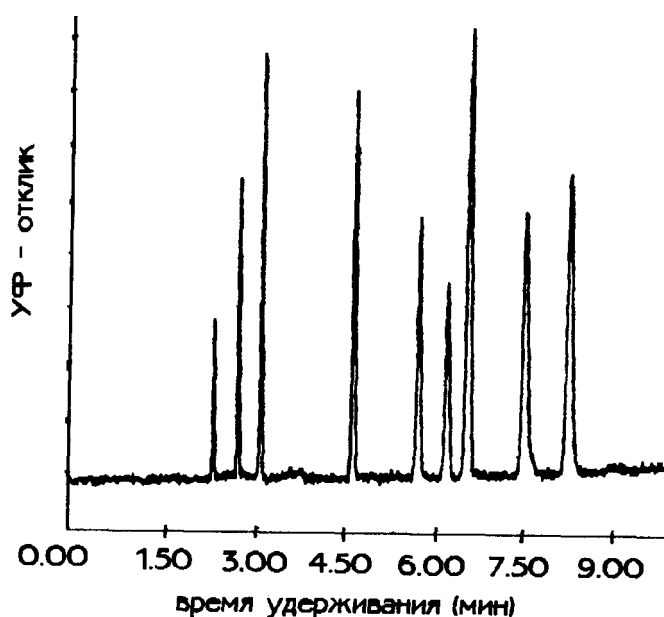


Рис. 107. Разделение с помощью ЭХ в капилляре, наполненном обращенной фазой.

Последовательность элюирования: тио-мочевина, бензиловый спирт, бензальдегид, бензол, 1,2-дихлорбензол, 1,2,3-трихлорбензол, 1,2,3,4-тетрахлорбензол, пентахлорбензол, гексахлорбензол. Условия разделения: длина капилляра 28.5 см, 50 мкм, наполнитель - Hypersil ODS (3мкм), ввод пробы: 2.5 кВ в течение 5 с, наложенное поле 45 кВ (2 мкА), детектирование при 220 нм, подвижная фаза - 2 мМ динатрийтетраборат, 80% апетонитрил, pH 8.7.

16. Перспективы

В таблице 31 представлены описанные разделительные системы, применение которых основано на миграции, обусловленной электрическим полем. Наиболее часто применяемой системой является, конечно, КЭ в кварцевых капиллярах (открытых трубках) с незаполненными или поверхностно-модифицированными стенками капилляра. Нейтральные молекулы также могут быть разделены в этих системах с помощью добавок мицеллообразователей.

По сравнению с классическим электрофорезом КЭ имеет следующие преимущества:

- очень высокая эффективность разделения;
- простое детектирование в режиме реального времени и возможность количественного анализа;
- простота хранения;
- короткие времена анализов;
- возможность автоматизации;
- небольшой расход реактивов.

По сравнению с ВЭЖХ преимущества заключаются в следующем:

- высокая эффективность разделения;
- быстрое установление равновесия при изменении условий анализов.

Недостатки КЭ заключаются в следующем:

- детектирование УФ-детекторами с низкой чувствительностью к изменению концентрации;
- относительно плохая воспроизводимость и сложность управления ЭОП;
- адсорбция анализируемых веществ на стенках капилляра, приводящая к потере эффективности.

В настоящее время коммерчески доступны приборы, некоторые из них - второго поколения, позволяющие проводить рутинные измерения. Это отражается также на характере публикаций • число работ, ориентированных на практику, перекрывает число чисто методических или теоретических работ. В 1990 году в обзоре по аналитической химии под рубрикой "Капиллярный электрофорез" приведены только 225 работ, из которых более половины относились к 1988/89 годам, а в обзоре за 1990/91 годы приведены уже 523 публикации.

Появились также первые монографии и обзорные работы.

Рекомендуемые книги:

J.Vindevogel, P.Sandra, Introduction to MEKC, in: Chromatographic Methods, Hutig Verlag, Heidelberg 1992

Editor: NAGuzman, Capillary electrophoresis technology, in Chromatographic science series, Volume 64, M.Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong 1993

S.F.Y. Li, Capillary electrophoresis, in J. Chromatogr. Library, Vol.52, Elsevier, Amsterdam 1992

P.Jandik, G.Bonn, Capillary electrophoresis of small molecules and ions, VCN-Verlag, Weinheim 1993

R.Kuhn, S.Hofstetter-Kuhn, Capillary electrophoresis, principle and practice Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1993

D.N.Heiger, High performance, capillary electrophoresis, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn Analytical Division, Germany 1992

Обзорные статьи

W.G.Kuhr, Anal. Chem. 1990, 63,403R-414R

W.G.Kuhr, Anal. Chem. 1992, 64, 389R-407R

H.Engelhardt, W.Beck, J.Kohr, T.Schmitt, Angew. Chem. 1993, 105,659-680.

Список сокращений, часто встречающихся в тексте:

ВЭЖХ -высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТТ - высота эквивалентной теоретической тарелки
ГХ - газовая хроматография
ДДСН - додецилсульфат натрия
ИОХ - ионообменная хроматография
ИТФ -изотахофорез
ИЭФ - изоэлектрическая фокусировка
КГЭ - капиллярный гелевый электрофорез
КЗЭ -капиллярный зонный электрофорез
ККМ - критическая концентрация мицеллообразования
КЭ - капиллярный электрофорез
ЛПА - линейный полиакриламидный гель
ММ - молекулярная масса
МЭКХ - мицеллярная электрокинетическая хроматография
ОСО - относительное среднеквадратичное отклонение
ПААГ-электрофорез - полиакриламидный гель-электрофорез
ПАВ - поверхностно-активное вещество
ПВП -поливинилпирролидон
ПЭГ - полиэтиленгликоль
ПЭИ - полиэтиленимин
СКФХ - сверхкритическая флюидная хроматография
Трис - трис(гидроксиметиламинометан)
ФМОК - флуоренилметилоксикарбонил
ХГВ - хроматография гидрофобного взаимодействия
ЦД - циклодекстрин
ЦТАБ - цетилтриметиламмонийбромид
ЭОП - электроосмотический поток
ЭХ - электрохроматография